

Pr

# Biochemische Zeitschrift.

Beiträge  
zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

**E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin**

unter Mitwirkung von

**H. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, G. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galcotti-Neapel, H. J. Hamburger-Göttingen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, E. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolt-Buenos-Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Prag, Ch. Porcher-Lyon, F. Roehmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sørensen-Kopenhagen, A. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklassa-Prag, A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Taubert-Budapest, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.**

Redigiert von

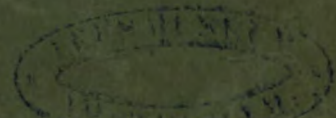
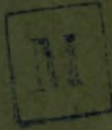
**C. Neuberg-Berlin.**

Achtunddreißigster Band.



Berlin.

Verlag von Julius Springer.  
1912.



QP501  
.B58  
v. 38

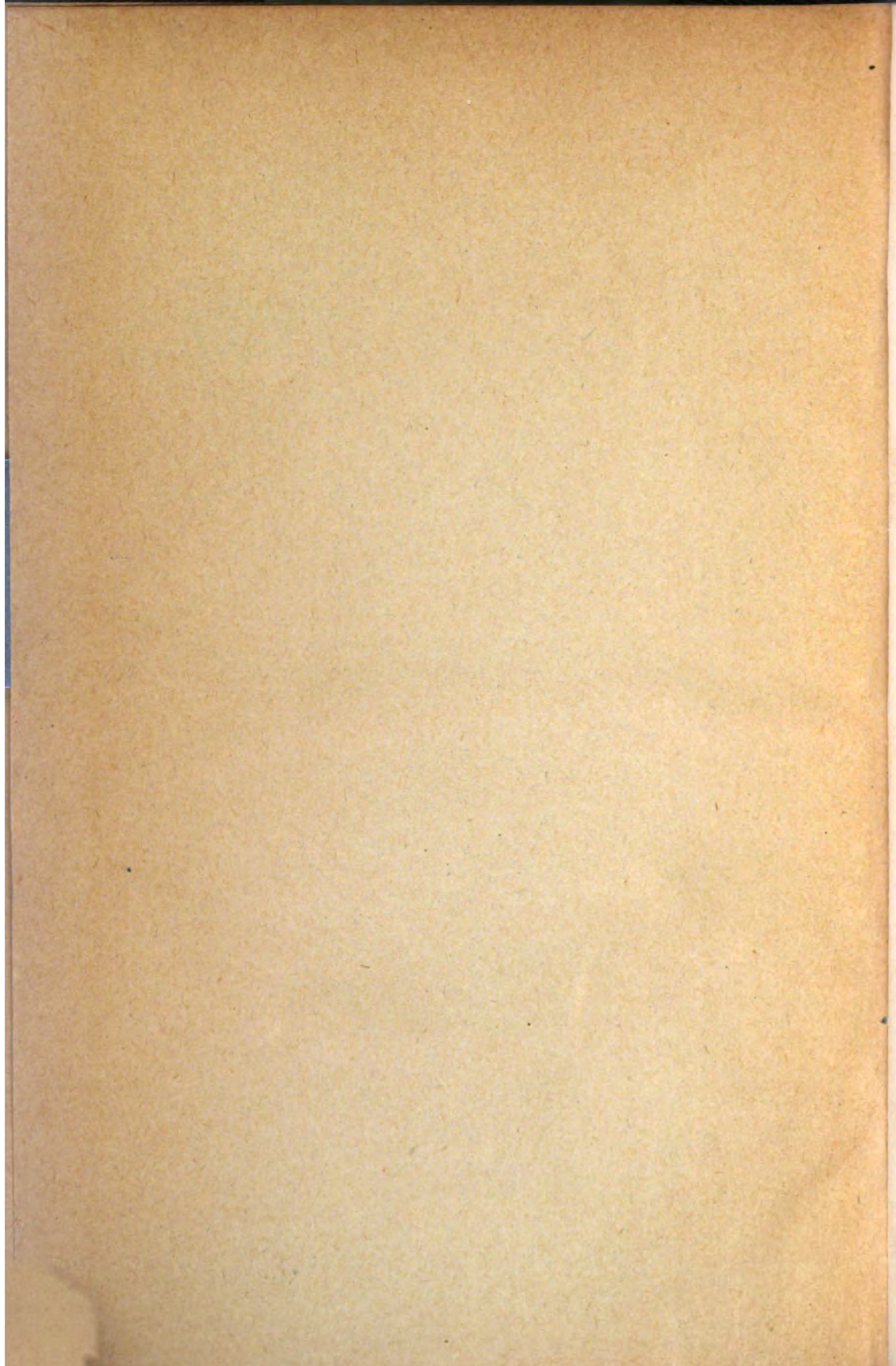
5

CHEMISTRY LIBRARY



**CHEMISTRY LIBRARY**

**JOURNAL**  
Does Not Circulate



# Biochemische Zeitschrift.

Beiträge  
zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

**E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin**

unter Mitwirkung von

**M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durrig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, G. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, E. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, E. Keber-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos-Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. F. F. Paul-Wien, E. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Frag, Ch. Percher-Lyon, F. Rochmann-Breslau, F. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklass-Frag, A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Tangl-Budapest, H. v. Tappeler-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgenuth-Berlin.**

Redigiert von

**C. Neuberg-Berlin.**

**Achtunddreißigster Band.**



**Berlin.**

**Verlag von Julius Springer.**

**1912.**



351304

QP501  
.B58  
v. 38

VEREINIGTE ARABISCHE  
EMIRATE

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Chem

OCT 31 1949

## Inhaltsverzeichnis.

	Seite
<b>Furlewitsch, K.</b> Untersuchungen über die Eiweißsynthese bei niederen Pflanzen . . . . .	1
<b>Edelstein, F. und F. v. Csenka.</b> Über den Eisengehalt der Kuhmilch . . . . .	14
<b>Hári, Paul.</b> Über den Einfluß des Adrenalins auf den Gaswechsel . . . . .	23
<b>Minevic, Stephan und Bella Hanknecht.</b> Über einige Chlorderivate des Cholesterins . . . . .	46
<b>Parnas, Jakob.</b> Über das Schicksal der stereoisomeren Milchsäuren im Organismus des normalen Kaninchens . . . . .	53
<b>Vas, Bernhard.</b> Beiträge zur Kreatinin- und Kreatinausscheidung unter pathologischen Verhältnissen . . . . .	65
<b>Hasselbalch, K. A. und Chr. Lundsgaard.</b> Elektrometrische Reaktionsbestimmung des Blutes bei Körpertemperatur . . . . .	77
<b>Petry, Eugen.</b> Zur Chemie der Zellgranula . . . . .	92
<b>Pollmanti, Osw.</b> Untersuchungen über die Topographie der Enzyme im Magen-Darmrohr der Fische . . . . .	113
<b>Bresina, Ernst und Walther Kolmer.</b> Über den Energieverbrauch bei der Geharbeit unter dem Einfluß verschiedener Geschwindigkeiten und verschiedener Belastungen . . . . .	129
<b>Bach, A.</b> Zur Kenntnis der Reduktionsfermente . . . . .	154
<b>Dienes, Ludwig.</b> Zur Frage der individuellen Verschiedenheit der Blutkörperchen . . . . .	159
<b>Glensa, G.</b> Bemerkungen zu der Arbeit von Julius Katz: Über die Ausscheidung des Chinins beim Hunde und über eine neue Methode der quantitativen Chininbestimmung . . . . .	161
<b>Battelli, F. und L. Stern.</b> Bemerkungen zur Haupt- und akzessorischen Atmung . . . . .	163
<b>Bang, Ivar.</b> Über die Verteilung der reduzierenden Stoffe im Blute . . . . .	166
<b>Bang, Ivar.</b> Zur Bestimmung des Harnzuckers . . . . .	168
<b>Schlekele, G.</b> Untersuchungen über die innere Sekretion der Ovarien I. . . . .	169
<b>Schlekele, G.</b> Untersuchungen über die innere Sekretion der Ovarien II. . . . .	191
<b>Schlekele, G.</b> Zur Lehre von der inneren Sekretion der Placenta . . . . .	214
<b>Loew, Oscar.</b> Über die Giftwirkung von oxalsauren Salzen und die physiologische Funktion des Calciums . . . . .	226
<b>Feinschmidt, J.</b> Die Säureflockung von Lecithinen und Lecithin-Eiweißgemischen . . . . .	244
<b>von Gröer, Franz.</b> Über die Prodigiosusgelatinase . . . . .	252

	Seite
<b>Tanaka, Masahiko.</b> Über Kalkresorption und Verkalkung . . . . .	285
<b>de Jager, L.</b> Über den Einfluß von Magnesiumsalzen und Natriumsulfat auf die Harnacidität . . . . .	294
<b>Dexiades, Leonidas.</b> Über die Glucose des Bluteserums . . . . .	306
<b>Koenigsfeld, Harry.</b> Untersuchungen über die physikalisch-chemischen Grundlagen der Seliwanoff'schen Lävulose-reaktion . . . . .	310
<b>Herlitzka, Amedeo.</b> Über den Zustand des Chlorophylls in der Pflanze und über kolloidales Chlorophyll . . . . .	321
<b>Obermayer, Friedrich und Robert Wilhelm.</b> Über formoltitrimetrische Untersuchungen an Eiweißkörpern I . . . . .	331
<b>Forschbach, J. und J. Severin.</b> Bemerkung zu der Arbeit von K. Reicher und E. H. Stein . . . . .	344
<b>Reicher, K. und E. H. Stein.</b> Bemerkung zur vorausgehenden Notiz der Herren Forschbach und Severin . . . . .	344
<b>Heubner, W. und H. Rosenberg.</b> Photographische Bestimmung der Intensitätsverteilung in Blutspektren . . . . .	345
<b>Welland, Walter.</b> Beitrag zur Lehre von der Uraminosäurebildung . . . . .	385
<b>Emden, Gustav und Ernst Schmitz.</b> Über synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber. II . . . . .	393
<b>Kondo, Kura.</b> Über synthetische Aminosäurebildung in der Leber. III . . . . .	407
<b>Fellner, Hanni.</b> Über synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber. IV. . . . .	414
<b>Ohta, Kohshi.</b> Über das Verhalten der d- $\alpha$ -Glucoseptonsäure im Organismus des Kaninchens, Hundes und Menschen . . . . .	421
<b>Stegfried, M. und R. Zimmermann.</b> Über die Bestimmung von Phenol und Parakresol in ihren Gemischen . . . . .	434
<b>Paladino, Raffaele.</b> Ob und wie die Bestandteile der Gehirns substanz sich bei normalen und Hungertieren verändern . . . . .	443
<b>Fingerling, Gustav.</b> Die Bildung von organischen Phosphorverbindungen aus anorganischen Phosphaten . . . . .	448
<b>Brach, Hugo.</b> Untersuchungen über den chemischen Aufbau des Chitins . . . . .	468
<b>Thoms, H. und F. Thümen.</b> Über die physiologische Wirkung der vier isomeren Piperonyl-acrylsäure-butylamide . . . . .	492
<b>Pollmanti, Osw.</b> Über den Fettgehalt der Leber einiger Selachier während der Zeit der Schwangerschaft . . . . .	497
<b>Gramenitzki, M.</b> Über die Regeneration des Komplements (nach Erwärmung). . . . .	501
<b>Karczag, L.</b> Über die Gärung der verschiedenen Weinsäuren . . . . .	516



# Untersuchungen über die Eiweißsynthese bei niederen Pflanzen.

Von  
K. Puriewitsch.

(Aus dem botanischen Institut der Universität Kiew.)

(Eingegangen am 8. November 1911.)

Die Frage über die Eiweißsynthese im Pflanzenorganismus ist bisher noch unaufgeklärt, obgleich zahlreiche Untersuchungen der Lösung dieses Problems gewidmet sind. Was höhere Pflanzen betrifft, so ist es schon lange bekannt, daß in der Natur die einzige Stickstoffquelle für die Eiweißsynthese in diesen Pflanzen Nitratsalze sind, die in der Pflanzenzelle bis zum Ammoniak und dessen Derivaten reduziert werden können. Von welcher Art aber ist der weitere Verlauf der Eiweißsynthese, welches sind die stickstoffhaltigen Zwischenprodukte, deren Bildung dem Aufbau der Eiweißstoffe vorangeht — das sind Fragen, die bisher noch nicht aufgeklärt sind.

Andererseits ist die Möglichkeit der Eiweißsynthese bei höheren Pflanzen auch aus fertigen organischen Stickstoffverbindungen nicht ausgeschlossen, wie das durch die Untersuchungen von Lutz<sup>1)</sup>, Hansteen<sup>2)</sup> u. a. nachgewiesen wurde.

Aus diesen und anderen Untersuchungen folgt, daß nicht alle Stickstoffverbindungen für die Eiweißsynthese und folglich für die Entwicklung der Pflanzen brauchbar sind. Das größte Versuchsmaterial für die Aufklärung dieser Frage enthalten die

---

<sup>1)</sup> Lutz, Recherches sur la nutrition des végétaux à l'aide des substances azotées de nature organique. Ann. d. sciences nat., Bot. 7 1, 1898.

<sup>2)</sup> Hansteen, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißbildung usw. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 14, 362, 1896.

umfangreichen Untersuchungen von Czapek<sup>1)</sup> über die Stickstoffassimilation bei *Aspergillus niger*.

Czapek hat richtig als Objekt für seine Versuche die chlorophyllose Pflanze von einfacher Organisation ausgewählt, die fast ausschließlich aus Zellen besteht, deren physiologische Funktionen die gleichen sind, weil man nur bei solchen Pflanzen die Bildung und Umwandlung von Nährstoffen in klarer und zugänglicher Form beobachten kann.

Czapek kultivierte die Mycelien von *Aspergillus niger* auf einer Nährlösung, die die nötigen Mineralsalze und 3% Saccharose enthielt; zu dieser Nährlösung wurden verschiedene Stickstoffverbindungen — Ammonsalze, Amide, Aminosäuren, Nitrile, Azoverbindungen usw. — hinzugefügt. Es wurden 196 Verbindungen geprüft, von denen sich 127 für die Nahrung und Entwicklung von *Aspergillus niger* als ganz geeignet erwiesen.

Als Maß für die Eignung von verschiedenen Stickstoffverbindungen in Czapeks Versuchen diente außer der Trockensubstanz des Myceliums auch die Stickstoffmenge, die vom Pilze assimiliert wurde. Es ist klar, daß weder die Trockensubstanz noch der Stickstoffgehalt des Myceliums als richtiges Maß für die Assimilation von stickstoffhaltigen Verbindungen dienen kann, besonders bei der langen Dauer des Versuchs.

Eine viel genauere Beurteilung von der Brauchbarkeit verschiedener Stickstoffverbindungen für die Eiweißsynthese kann man aus den Bestimmungen der Energie erhalten, die bei der Eiweißsynthese verbraucht wird.

Wie bekannt, kann die Atmungsintensität ziemlich gut als ein Maß für das Wachstum der Pflanze, sowie auch für die Bildung und die Umwandlung der Nährstoffe dienen. Je stärker das Wachstum ist, desto größer ist die Atmungsintensität. Ebenso erfordern die Prozesse der Stoffsynthese, die in der Pflanzenzelle stattfinden, einen Energieverbrauch. Diese Energie bildet sich durch die Oxydation der organischen Stoffe bei der Atmung, die Fälle ausgenommen, in der diese Energie von außen der Zelle geliefert wird.

Auf Grund dieser Voraussetzung hielt ich es für geboten, über die Brauchbarkeit verschiedener Stickstoffverbindungen für die Eiweißsynthese nach der Atmungsintensität der Versuchspflanzen zu schließen. Als Objekt für meine Versuche bediente ich mich der Mycelien von *Aspergillus niger*.

Da ich voraussetzte, daß bei schwieriger Verarbeitung einer Stickstoffverbindung zu den Eiweißstoffen des Myceliums ein

---

<sup>1)</sup> Czapek, Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Pflanzen. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 2 und 3.

größerer Energieverbrauch erforderlich ist und folglich auch ein größerer Verbrauch der Stoffe, die bei der Atmung oxydiert werden, so wählte ich als Maß für diesen Verbrauch das Verhältnis der Kohlensäuremenge, die das Mycelium von *Aspergillus niger* während des Versuchs bildet, zur Trockensubstanzmenge desselben Myceliums, oder, was dasselbe ist, die auf die Einheit von Trockensubstanz des Myceliums gebildete Kohlensäuremenge.

Diese Methode der Energiebestimmung ist nur in dem Falle zulässig, wenn die chemische Zusammensetzung des Myceliums bei verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen dieselbe bleibt.

Aus der Literatur sind mir die Untersuchungen von Abderhalden und Rona<sup>1)</sup> über die Zusammensetzung des Eiweißes der Mycelien von *Aspergillus niger* bekannt. Die Verfasser kultivierten Mycelien von diesem Schimmelpilz auf den Nährlösungen, die als Stickstoffquelle enthielten: 1) 1% Kaliumnitrat, 2) 1% Glykokoll und 3) 1% Glutaminsäure. Die Mycelien, die sich auf diesen Nährlösungen entwickelten, hatten alle denselben Gesamtstickstoffgehalt, nämlich:

Mycelium auf Kaliumnitratlösung . . . . .	3,68%
„ „ Glykokollösung . . . . .	3,85%
„ „ Glutaminsäurelösung . . . . .	3,52%

Die Verfasser schieden dann die Eiweißstoffe aus den Mycelien aus, unterzogen diese Eiweißstoffe der Hydrolyse und erhielten für alle drei Kulturen dieselben Abbauprodukte. Aus diesen Versuchen also folgt, daß die Zusammensetzung der Eiweißstoffe sowie ihre Bildung von der Natur der Stickstoffquelle nicht abhängt.

Man kann sich denken, daß eine leichtere oder schwerere Eiweißsynthese von der Natur der dargebotenen Stickstoffquelle abhängt und daß folglich die bei der Synthese verbrauchte Energiemenge verschieden ist und durch die Atmungsenergie bestimmt werden kann.

Aus den Versuchen von Czapek, Emmerling u. a. folgt, daß die verschiedensten Verbindungen als Stickstoffquellen für das Mycelium von *Aspergillus niger* dienen können. Für mich aber waren jene Aminverbindungen von großem Interesse, die sich bei der Hydrolyse von Eiweißstoffen bilden.

---

<sup>1)</sup> Abderhalden und Rona, Die Zusammensetzung des „Eiweiß“ von *Aspergillus niger* bei verschiedener Stickstoffquelle. Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 179 bis 186, 1905.

Emmerling<sup>1)</sup> beobachtete, daß sich die Mycelien von *Aspergillus niger*, *Asp. clavatus* und *Asp. Oryzae* am besten entwickeln, wenn denselben als Stickstoffquelle Serin, Alanin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Asparaginsäure, Glutaminsäure, sowie auch  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure dargeboten sind. Für *Penicillium glaucum* sind Glykokoll,  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Glutaminsäure und  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure die besten Stickstoffquellen.

Um den Wert von verschiedenen Stickstoffverbindungen für die Eiweißsynthese aufzuklären, stellte ich eine Reihe von Versuchen an, in denen ich als Kohlenstoffquelle Dextrose und andere stickstofffreie organische Verbindungen und als Stickstoffquelle Nitratsalze, Ammonsalze, Amide, Aminosäuren und andere Stickstoffverbindungen benutzte.

Ich kultivierte Mycelien von *Aspergillus niger* auf der Nährlösung, die die nötigen Mineralsalze und Dextrose oder andere ternäre Verbindungen enthielt. Zu dieser Nährlösung wurden in den einzelnen Versuchen verschiedene stickstoffhaltige Verbindungen zugefügt in solcher Quantität, daß die gesamte Stickstoffmenge in der Nährlösung 0,2 g war.

Als Kulturgefäße benutzte ich konische Kolben von ca. 150 qcm Bodenfläche und 400 ccm Inhalt. Der mit der Nährlösung (100 ccm) beschickte Kulturkolben wurde sterilisiert und mit Sporen von *Aspergillus niger* besät. Dann wurde der Kolben mit einem Kautschukpfropfen verschlossen, durch den zwei Glasröhren durchgingen. Von diesen endete eine bei dem inneren Rande des Kautschukpfropfens und die andere über die Oberfläche der Nährlösung. Mit Hilfe dieser Röhren wurde die von Kohlensäure befreite Luft durch den Kolben während des Versuchs ununterbrochen geleitet. Die Erneuerung der Luft im Kulturkolben war sehr langsam, da in 24 Stunden 12 l Luft durch den Kolben geleitet wurden, und nur am Versuchsende wurde ein schnellerer Luftstrom eingestellt, um alle Kohlensäure aus dem Kulturkolben zu entfernen.

Die Luft ging aus dem Kulturkolben durch die U-förmigen Glasröhren, die mit konzentrierter Schwefelsäure durchtränkte Bimssteinstückchen enthielten, dann durch zwei Kaliapparate mit 20%iger Ätzkalilösung und durch eine U-förmige Röhre mit Chlorcalcium. Durch die Kontrollversuche konnte ich mich überzeugen, daß sogar bei dem schnellstem Luftstrom, den ich verwendete, alle Kohlensäure absorbiert wurde.

Der mit Sporen von *Aspergillus niger* besäte Kulturkolben wurde dann in einen Thermostaten bei 30° gestellt. Die Absorptionsapparate (Röhren mit Natronkalk und Kaliapparate) standen außerhalb des Thermostaten.

Jeder Versuch dauerte 48 Stunden. Nach beendigtem Versuche wurden die Kaliapparate gewogen; das Mycelium wurde am Filter von der

<sup>1)</sup> Emmerling, Aminosäuren als Nährstoffe für niedere Pflanzen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 2289, 1902.

Nährlösung abgelöst, mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Filterpapier abgepreßt und bei 100° getrocknet.

Fast in allen Versuchen bildete sich nach 48 Stunden ein ziemlich festes weißes Myceliumhäutchen, das die ganze Oberfläche der Nährlösung bedeckte. Am Ende von vielen Versuchen begann schon Sporenbildung, und die Mycelien bekamen eine schwarze Farbe.

Um die Frage aufzuklären, wie sehr das Trockengewicht der auf derselben Nährlösung ausgewachsenen Mycelien schwankt, habe ich folgende Versuche angestellt. Ich säte Sporen von *Aspergillus niger* auf 100 ccm der Raulinschen Nährlösung, die sich im oben beschriebenen Kulturkolben mit 150 qcm Bodenfläche befand. Die Kulturkolben blieben während 48 Stunden im Thermostaten bei 30° stehen. Nach dieser Zeit trocknete ich die Mycelien bei 100° und bestimmte deren Trockengewicht. Es wurde gefunden:

im 1. Versuche . . . . .	1,482 g
„ 2. „ . . . . .	1,518 g
„ 3. „ . . . . .	1,477 g
„ 4. „ . . . . .	1,470 g

Wie sich aus diesen Versuchsergebnissen ersehen läßt, sind die Schwankungen vom Trockengewicht der Mycelien in den Versuchsbedingungen ziemlich klein. In den Versuchen mit verschiedenen Stickstoffquellen waren diese Schwankungen des Trockengewichts für die Versuche mit derselben Stickstoffquelle größer, aber diese Tatsache hat keine Bedeutung für die Endresultate, weil nur die Zahlenverhältnisse zwischen Atmungsenergie und Trockensubstanz der Mycelien wichtig sind, die, wie aus den unten angeführten Tabellen ersichtlich ist, nur kleinen Schwankungen unterworfen sind.

Die Resultate meiner Versuche sind in den Tabellen I und II zusammengestellt. In diesen Tabellen sind angeführt: 1. Die Trockensubstanz des Myceliums; 2. die Menge der ausgeschiedenen Kohlensäure und 3. das Verhältnis zwischen der Kohlensäuremenge und Trockensubstanz des Myceliums, oder, was dasselbe ist, die Menge der auf die Einheit der Trockensubstanz ausgeschiedenen Kohlensäure.

Alle Kulturen von *Aspergillus*, nur zwei ausgenommen, sind bei 30° gewachsen.

Tabelle I.  
Kohlenstoffquelle: Dextrose.

Stickstoffquelle	Angaben der einzelnen Versuche			Mittelzahlen		
	Trocken- substanz des Myceliums	CO <sub>2</sub> ausge- schie- den	Verhältnis zwischen CO <sub>2</sub> und Trockenab- stanz	Trocken- substanz des Myceliums	CO <sub>2</sub> ausge- schie- den	Verhältnis zwischen CO <sub>2</sub> und Trockenab- stanz
1. Kaliumnitrat . . .	1,438	1,673	1,16	1,514	1,874	1,23
	1,603	1,996	1,24			
	1,502	1,953	1,30			
2. Rhodankalium . .	0,315	0,232	0,73	0,347	0,261	0,75
	0,380	0,291	0,70			
3. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . .	1,383	1,766	1,27	1,722	1,962	1,14
	1,895	2,004	1,05			
	1,800	1,982	1,10			
	1,811	2,098	1,16			
4. Methylamin (Chlor- hydrat) . . . . .	1,136	1,036	0,91	1,127	1,031	0,91
	1,118	1,027	0,92			
5. Dimethylamin (Chlor- hydrat) . . . . .	1,585	1,370	0,86	1,573	1,379	0,87
	1,562	1,389	0,88			
6. Trimethylamin (Chlorhydrat) . .	0,466	0,478	1,02	0,455	0,488	1,07
	0,445	0,499	1,12			
7. Äthylamin (Chlor- hydrat) . . . . .	1,073	1,327	1,23	1,138	1,345	1,18
	1,204	1,363	1,13			
8. Diäthylamin (Chlor- hydrat) . . . . .	0,535	0,682	1,27	0,554	0,741	1,33
	0,584	0,801	1,37			
9. Glykokoll . . . . .	2,258	1,501	0,66	2,183	1,484	0,68
	2,194	1,460	0,66			
	2,097	1,491	0,71			
	1,346 <sup>1)</sup>	0,940	0,70			
10. Methylglykokoll (Sarkosin) . . . .	1,942	1,587	0,81	1,872	1,607	0,85
	1,803	1,628	0,90			
11. Alanin . . . . .	2,358	1,802	0,76	2,324	1,820	0,78
	2,300	1,798	0,78			
	2,324	1,860	0,80			
12. Phenylalanin . . .	1,120	1,987	1,68	1,076	1,930	1,79
	1,033	1,874	1,81			
13. Hippursäure . . . .	1,148	1,483	1,29	1,154	1,536	1,33
	1,160	1,590	1,37			
14. Leucin . . . . .	1,683	1,490	0,89	1,615	1,397	0,86
	1,538	1,310	0,85			
	1,625	1,391	0,85			

1) Die Kultur blieb bei 22 bis 25° stehen.

Tabelle I (Fortsetzung).

Stickstoffquelle	Angaben der einzelnen Versuche			Mittelzahlen		
	Trocken- substanz des Myceliums	CO <sub>2</sub> ausge- schieden	Verhältnis zwischen CO <sub>2</sub> und Trockensub- stanz	Trocken- substanz des Myceliums	CO <sub>2</sub> ausge- schieden	Verhältnis zwischen CO <sub>2</sub> und Trockensub- stanz
15. Tyrosin <sup>1)</sup> . . . . .	{ 1,475 1,534 1,428	{ 1,404 1,427 1,451	{ 0,95 0,93 1,01	{ 1,479	{ 1,427	{ 0,96
16. Asparaginsäure . . . . .	{ 2,445 2,507 2,461	{ 2,139 2,030 2,045	{ 0,87 0,80 0,83	{ 2,471	{ 2,071	{ 0,83
17. Asparagin . . . . .	{ 1,676 1,749 1,696	{ 1,310 1,492 1,390	{ 0,77 0,85 0,82	{ 1,707	{ 1,397	{ 0,83
18. Glutaminsäure . . . . .	{ 1,921 1,888 1,625	{ 1,665 1,594 1,391	{ 0,85 0,80 0,85	{ 1,811	{ 1,550	{ 0,84
19. Oxamid . . . . .	{ 0,253 0,270	{ 0,264 0,277	{ 1,04 1,04	{ 0,261	{ 0,270	{ 1,04
20. Acetamid . . . . .	{ 0,947 0,923	{ 0,713 0,790	{ 0,75 0,85	{ 0,935	{ 0,751	{ 0,80
21. Propionamid . . . . .	{ 0,181 0,188	{ 0,269 0,279	{ 1,48 1,48	{ 0,184	{ 0,274	{ 1,48
22. Harnstoff . . . . .	{ 1,981 1,808 1,855 1,498	{ 1,824 1,712 1,793 1,569	{ 0,92 0,91 0,96 1,04	{ 1,785	{ 1,724	{ 0,96
23. Methylharnstoff . . . . .	{ 0,375 0,397	{ 0,234 0,259	{ 0,62 0,65	{ 0,386	{ 0,246	{ 0,64
24. Alloxan . . . . .	0,146	0,142	0,97	—	—	—
25. Phenylharnstoff . . . . .	{ 0,123 0,130	{ 0,324 0,290	{ 2,63 2,23	{ 0,126	{ 0,307	{ 2,43
26. Guanidin . . . . .	1,122	1,283	1,14	—	—	—
27. Pepton . . . . .	{ 1,022 (0,342 <sup>2)</sup> )	{ 1,479 0,455	{ 1,44 1,33	—	—	—
28. Schwefelsaures Anilin . . . . .	0,285	0,374	1,36	—	—	—
29. Hühnereiweiß . . . . .	{ 0,724 0,607	{ 1,153 1,027	{ 1,59 1,69	—	—	—

<sup>1)</sup> Da Tyrosin im Wasser schwer löslich ist, so blieb dessen größerer Teil auf dem Kolbenboden nicht gelöst.

<sup>2)</sup> Bei 22 bis 28°.

Aus diesen Versuchsangaben folgt, daß die Verhältnisse der Kohlensäuremenge zur Trockensubstanz des Myceliums am kleinsten sind für Aminosäuren, sowie auch für das Ammoniak und seine Derivate. Dies bedeutet, daß der geringste Energieverbrauch für die Eiweißsynthese dann stattfindet, wenn Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Acetamid und Methylharnstoff als Stickstoffquellen dargeboten sind. Es ist bemerkenswert, daß man für Rhodanzalze dasselbe bemerken kann. Die Einführung der Methylgruppe in die organische Verbindung, die als Stickstoffquelle dient, wird von einer Verminderung der Energiemenge begleitet, die für die Eiweißsynthese verbraucht wird. Dagegen erzeugt die Einführung der Äthylgruppe und besonders der Phenylgruppe eine Vergrößerung des Energieverbrauchs. Pepton und Hühnereiweiß weisen einen größeren Energieverbrauch auf, als man erwarten konnte.

In der Tabelle II sind die Resultate der Versuche angeführt, in denen andere Verbindungen, hauptsächlich organische Säuren, als Kohlenstoffquellen dienten.

Tabelle II.

Stickstoffquelle	Trockensubstanz des Myceliums	CO <sub>2</sub> ausgeschieden	Verhältnis zwischen CO <sub>2</sub> und Trockensubstanz
A. Kohlenstoffquelle: Bernsteinsäure.			
1. Kaliumnitrat . . . . .	0,335	0,724	2,16
2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,285	0,437	1,50
3. Acetamid . . . . .	0,256 0,232	0,222 0,232	0,87 1,00
4. Propionamid . . . . .	0,202	0,435	2,15
5. Glykokoll . . . . .	0,673 0,746	0,692 0,750	1,03 1,00
6. Harnstoff . . . . .	0,507 0,543	0,843 0,921	1,66 1,69
7. Methylharnstoff . . . . .	0,437	0,851	1,94
8. Phenylharnstoff . . . . .	0,275	0,684	2,48
9. Pepton . . . . .	0,481	0,975	2,02



Tabelle II (Fortsetzung).

Stickstoffquelle	Trocken- substanz des Myceliums	CO <sub>2</sub> aus- geschieden	Verhältnis zwischen CO <sub>2</sub> und Trocken- substanz
------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	--

## B. Kohlenstoffquelle: Äpfelsäure.

1. Kaliumnitrat . . . . .	{ 0,176 0,208	0,357 0,429	2,03 2,06
2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,857	1,620	1,88
3. Acetamid . . . . .	0,334	0,608	1,79
4. Propionamid . . . . .	0,311	0,797	2,56
5. Glykokoll . . . . .	{ 0,798 0,772	1,523 1,530	1,90 2,00
6. Harnstoff . . . . .	{ 0,385 0,321	0,901 0,827	2,34 2,79
7. Methylharnstoff . . . . .	0,322	0,734	2,28
8. Phenylharnstoff . . . . .	0,390	1,222	3,13
9. Pepton . . . . .	0,407	1,107	2,72

## C. Kohlenstoffquelle: Weinsäure.

1. Kaliumnitrat . . . . .	0,420	1,495	3,56
2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,502	1,517	3,02
3. Acetamid . . . . .	0,450	0,889	1,97
4. Propionamid . . . . .	0,403	1,583	3,43
5. Glykokoll . . . . .	{ 0,627 0,649	1,475 1,683	2,35 2,59
6. Harnstoff . . . . .	{ 0,605 0,584	2,058 2,008	3,60 3,43
7. Methylharnstoff . . . . .	0,345	1,470	4,26
8. Phenylharnstoff . . . . .	0,318	1,610	5,06
9. Asparagin . . . . .	0,758	2,033	2,68
10. Pepton . . . . .	0,512	1,893	3,69

## D. Kohlenstoffquelle: Citronensäure.

1. Harnstoff . . . . .	{ 0,766 0,759	1,435 1,538	1,87 2,02
------------------------	------------------	----------------	--------------

## E. Kohlenstoffquelle: Schleimsäure.

1. Harnstoff . . . . .	0,105	0,170	1,62
------------------------	-------	-------	------

Tabelle II (Fortsetzung).

Stickstoffquelle	Trocken- substanz des Myceliums	CO <sub>2</sub> aus- geschieden	Verhältnis zwischen CO <sub>2</sub> und Trocken- substanz
<b>F. Kohlenstoffquelle: Chinasäure.</b>			
1. Kaliumnitrat . . . . .	0,801	1,863	2,32
2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	1,126	2,216	1,96
3. Glykokoll . . . . .	0,483	0,916	1,90
4. Asparagin . . . . .	0,523	1,088	2,08
<b>G. Kohlenstoffquelle: Glycerin.</b>			
1. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,927	0,739	0,79
2. Acetamid . . . . .	0,350	0,247	0,70
3. Glykokoll . . . . .	0,821	0,795	0,96
<b>H. Kohlenstoffquelle: Mannit.</b>			
1. Kaliumnitrat . . . . .	0,143	0,420	2,93
2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	{ 0,685 0,241 <sup>1)</sup>	{ 0,578 0,202	{ 0,84 0,83
3. Glykokoll . . . . .	0,784	0,675	0,86
<b>J. Kohlenstoffquelle: Stärke.</b>			
1. Kaliumnitrat . . . . .	0,429	0,646	1,50
2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,372	0,460	1,23
3. Asparagin . . . . .	0,691	0,802	1,14

Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigen die Versuchsergebnisse der Tabelle I. Der Unterschied besteht nur darin, daß die ausgeschiedenen Kohlensäurequantitäten für organische Säuren viel größer sind als für Dextrose, welche Erscheinung immer bei der Einführung dieser Säuren in den Pflanzenorganismus beobachtet wird.

Um die Versuchsergebnisse, die in den Tabellen I und II angeführt sind, anschaulicher zu machen, habe ich die Zahlen für das Verhältnis der Kohlensäuremenge zur Trockensubstanz des Myceliums in der Tabelle III zusammengestellt.

Wie man aus diesen Zahlen ersieht, ist bei verschiedenen Kohlenstoffquellen das Verhältnis der ausgeschiedenen Kohlen-

<sup>1)</sup> Bei der Temperatur 22 bis 25°.

säure zur Trockensubstanz des Myceliums für Glykokoll, Acetamid, Asparagin, Glutamin- und Asparaginsäure, Leucin und Harnstoff das kleinste.

Tabelle III.

## A. Kohlenstoffquelle: Dextrose.

1. Methylharnstoff . . . . .	0,64	16. Oxamid . . . . .	1,04
2. Glykokoll . . . . .	0,68	17. Trimethylamin . . . . .	1,07
3. Rhodankalium . . . . .	0,75	18. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,14
4. Alanin . . . . .	0,78	19. Guanidin . . . . .	1,14
5. Acetamid . . . . .	0,80	20. Äthylamin . . . . .	1,18
6. Asparaginsäure . . . . .	0,83	21. Kaliumnitrat . . . . .	1,23
7. Asparagin . . . . .	0,83	22. Schwefelsaures Anilin . . . . .	1,31
8. Glutaminsäure . . . . .	0,85	23. Hippursäure . . . . .	1,33
9. Sarkosin . . . . .	0,85	24. Diäthylamin . . . . .	1,33
10. Leucin . . . . .	0,86	25. Pepton . . . . .	1,38
11. Dimethylamin . . . . .	0,87	26. Propionamid . . . . .	1,48
12. Methylamin . . . . .	0,91	27. Hühneriweiß . . . . .	1,60
13. Harnstoff . . . . .	0,96	28. Phenylalanin . . . . .	1,79
14. Tyrosin . . . . .	0,96	29. Phenylharnstoff . . . . .	2,42
15. Allozan . . . . .	0,97		

## B. Kohlenstoffquelle: Bernsteinsäure.

1. Acetamid . . . . .	0,88	6. Pepton . . . . .	2,02
2. Glykokoll . . . . .	1,02	7. Propionamid . . . . .	2,15
3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,50	8. Kaliumnitrat . . . . .	2,16
4. Harnstoff . . . . .	1,67	9. Phenylharnstoff . . . . .	2,48
5. Methylharnstoff . . . . .	1,94		

## C. Kohlenstoffquelle: Äpfelsäure.

1. Acetamid . . . . .	1,79	6. Harnstoff . . . . .	2,56
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,88	7. Propionamid . . . . .	2,56
3. Glykokoll . . . . .	1,95	8. Pepton . . . . .	2,72
4. Kaliumnitrat . . . . .	2,04	9. Phenylharnstoff . . . . .	3,13
5. Methylharnstoff . . . . .	2,28		

## D. Kohlenstoffquelle: Weinsäure.

1. Glykokoll . . . . .	2,47	6. Kaliumnitrat . . . . .	3,56
2. Asparagin . . . . .	2,68	7. Pepton . . . . .	3,69
3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,02	8. Methylharnstoff . . . . .	4,26
4. Propionamid . . . . .	3,43	9. Phenylharnstoff . . . . .	5,06
5. Harnstoff . . . . .	3,51		

Es unterliegt keinem Zweifel, daß bei der Eiweißsynthese aus verschiedenen Stickstoffverbindungen chemische Natur und Struktur der Moleküle die Hauptrolle spielen. Aus der Tatsache, daß die Mycelien von Schimmelpilzen oft ziemlich große Quantitäten von Ammoniak ausscheiden, wenn sie sich auf Nährsubstraten entwickeln, die Eiweiß, Pepton und Amidverbin-

dungen enthalten, ziehen einige Physiologen<sup>1)</sup> den Schluß, daß das Ammoniak an der Eiweißsynthese teilnimmt. Andere Physiologen, wie Czapek, meinen, auf die Tatsache gestützt, daß sich die Entwicklung des Myceliums von *Aspergillus niger* am besten vollzieht, wenn die Aminosäuren in der Nährlösung zugegen sind, daß bei der Eiweißsynthese die Aminosäuren als Zwischenprodukte erscheinen, aus denen sich die Eiweißstoffe am leichtesten bilden.

Es gibt keine bestimmten Beweise, daß Ammoniak als stickstoffhaltiges Ausgangsmaterial bei der Eiweißsynthese erscheint, weil die Bildung von Ammoniak aus mehr kompliziert gebauten Stickstoffverbindungen noch nicht beweist, daß dasselbe für die Eiweißbildung durchaus verbraucht werden soll. Es ist wohl möglich, daß der Abbau von komplizierten Stickstoffverbindungen einen Prozeß vorstellt, dessen Bedeutung für uns bis jetzt noch nicht aufgeklärt bleibt. Andererseits steht die reichliche Ammoniakbildung, wie Butkewitsch<sup>2)</sup> bemerkt, mit der übermäßigen Anhäufung von Oxalsäure im Zusammenhang. Neutralisiert man die sich bildende Oxalsäure durch Calciumcarbonat und verhindert auf diese Weise deren Anhäufung in der Nährlösung, so wird die Ammoniakbildung aufgehoben, und in der Nährlösung erscheinen andere Stickstoffverbindungen, unter denen Tyrosin und Leucin vorwiegen. Außerdem steht die Tatsache der Anhäufung von großen Ammoniakmengen im Widerspruch mit der oben ausgesprochenen Ansicht, weil, wenn Ammoniak wirklich für die Eiweißsynthese verbraucht werde, man dessen Anhäufung kaum bemerken könnte.

Es ist viel wahrscheinlicher, daß sich Ammoniak als Nebenprodukt bei dem Abbau der stickstoffhaltigen Verbindungen hauptsächlich der Eiweißstoffe und Peptone bildet, aus denen bei diesem Prozeß Amidverbindungen entstehen.

Czapek, auf seine zahlreiche Kulturversuche mit *Aspergillus niger* gestützt, hat die Aminosäuren als eine besonders gute Stickstoffquelle hervorgehoben. Die Bestätigung seiner Ansicht sucht er in den Angaben

<sup>1)</sup> Raciborski, Sur l'assimilation des composées d'azote par les champignons. Bull. de l'Acad. d. Sc. Cracovie 1906, 733. — Hagem, Untersuchungen über norwegische Mucorineen 2, 90 bis 100, 1910.

<sup>2)</sup> Butkewitsch, Umwandlung der Eiweißstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung. Jahrb. f. wiss. Bot. 33, 147.

von Emmerling<sup>1)</sup> zu finden, der angegeben hat, daß nur  $\alpha$ -Aminosäuren, die sich bei der Eiweißhydrolyse bilden, für die Schimmelpilze als besonders gute Stickstoffquellen dienen, nicht aber die künstlich dargestellten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aminosäuren. Czapek nimmt an, daß die Eiweißsynthese sich am leichtesten vollzieht, wenn dem Pilze schon fertige Aminosäuren dargeboten werden. Die Bildung von Aminosäuren macht nach Czapeks Meinung der Pflanzenzelle die größten Schwierigkeiten. Dann erfolgt die Verkettung von Aminosäuren zu Polypeptiden und weiter durch Peptone und Albumosen relativ leicht der Aufbau der Eiweißstoffe.

Die Resultate meiner Versuche sprechen zugunsten der Meinung von Czapek. Der Energieverbrauch bei der Eiweißsynthese, die durch die Kohlensäureausscheidung gemessen wird, ist der kleinste in dem Falle, wenn die Aminosäuren als Stickstoffquellen dargeboten werden. Bei Ammonsalzen und besonders bei Nitratsalzen ist dieser Energieverbrauch bedeutend größer.

Eine Bestätigung der oben ausgesprochenen Meinung, daß Aminosäuren als die besten Stickstoffquellen bei der Eiweißsynthese dienen, kann man auch in der Tatsache finden, daß im Tierorganismus das Gleichgewicht in der Bildung und Zersetzung der Eiweißstoffe bei der Fütterung mit Amidverbindungen nicht gestört bleibt.

Sehr interessant ist die Tatsache, daß für Pepton und Hühnereiweiß, die als Stickstoffquellen dienen, der Energieverbrauch größer ist, als für viele andere Stickstoffverbindungen. Es scheint, daß diese Tatsache der Vorstellung über den Verlauf der Eiweißsynthese widerspricht, der in umgekehrter Richtung ausgeführt werden soll. Die Aneignung der Eiweißstoffe vollzieht sich aber wahrscheinlich wie bei Tieren, bei denen das als Nahrung eingeführte Eiweiß bis auf Aminosäuren gespalten wird und dann aus diesen die Eiweißbildung im Organismus stattfindet.

Die Resultate meiner Versuche erschöpfen natürlich die wichtige und verwickelte Frage über die Stickstoffquellen und Zwischenprodukte der Eiweißsynthese nicht. Durch diese Versuche möchte ich nur den Weg anzeigen, auf dem man die Aneignung von verschiedenen Stickstoffverbindungen im Pflanzenorganismus erklären kann. Das gäbe uns die Möglichkeit, der Beantwortung der Frage nach Zwischenprodukten bei der Eiweißbildung näher zu treten.

---

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

# Über den Eisengehalt der Kuhmilch.

Von

F. Edelstein und F. v. Csonka.

[Aus dem Kaiserin-Auguste-Victoria-Haus zur Bekämpfung der Suglingsterblichkeit im Deutschen Reiche.]

(Eingegangen am 6. November 1911.)

Die Literaturangaben über den Gehalt der Kuhmilch an Eisen schwanken in sehr weiten Grenzen. Man findet Werte zwischen 1 und 15 mg Fe pro Liter und darüber hinaus.

So geben z. B., um nur einige Daten herauszugreifen, König<sup>1)</sup> und auch Fleischmann<sup>2)</sup> den Eisengehalt der Kuhmilchflasche auf 0,3% Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> an, das sind 0,022 g Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oder 0,015 g Fe im Liter.

Friedjung<sup>3)</sup> fand in der Kuhmilch 1,2 bis 2,6 mg, Anselm<sup>4)</sup> 0,87 bis 1,03 mg pro Liter. Nach Bunge<sup>5)</sup> sind pro 1000 g 2,4 mg Fe enthalten.

Von neueren Untersuchungen wäre die Analyse von Fendler, Frank und Stueber<sup>6)</sup> zu erwähnen, die 4 bis 12 mg pro Liter gefunden haben. Mai<sup>7)</sup> gibt gelegentlich einer Untersuchung der sog. Eisenmilch den Gehalt von 1 bis 1,5 mg Fe pro Liter an. Lachs und

---

<sup>1)</sup> König, Die menschlichen Nahrungs- u. Genußmittel 2, 603, 1904.

<sup>2)</sup> Fleischmann, Lehrbuch der Milchwirtschaft, S. 56, 1908.

<sup>3)</sup> Friedjung, über den Eisengehalt der Frauenmilch usw. Molkerzeitg. 1901, 245.

<sup>4)</sup> Anselm, über den Eisengehalt der Milch. Centralbl. f. inn. Med. 16, 1895.

<sup>5)</sup> Bunge, Der Kali-, Natrium- und Chlorgehalt der Milch usw. Zeitschr. f. Biol. 10, 295 u. 305, 1874.

<sup>6)</sup> Fendler, Frank und Stueber, Eisenbestimmung in der Milch. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 16, 369, 1910.

<sup>7)</sup> Mai, über sog. Eisenmilch. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 19, 21, 1910.

Friedenthal<sup>1)</sup> fanden 1,3 mg mit Hilfe der von ihnen ausgearbeiteten colorimetrischen Methode.

Mit wenigen Ausnahmen wurden die meisten dieser Untersuchungen mit wenig Material ausgeführt. Mai hat 100 ccm zur Bestimmung verwendet, Bunge 132 g, Lachs und Friedenthal 5 ccm.

Die Methode, der sich die genannten Autoren bedienen, war verschieden; entweder colorimetrisch (Mai, Friedjung, Lachs und Friedenthal) oder titrimetrisch, und zwar mittels der Permanganatmethode.

Der Grund für diese so verschiedenen Werte kann nicht allein in den allerdings vielfach veralteten Methoden zu suchen sein.

Auf Anregung von Prof. Langstein hatten wir es unternommen, durch eigene Analysen die bis jetzt vorliegenden Werte einer Nachprüfung zu unterziehen.

Es lag uns vor allem daran, zugleich die Frage zu entscheiden, ob die Kuhmilch mehr oder weniger Eisen enthält als die Frauenmilch. Es geht dies aus der Literatur nicht immer deutlich hervor (jedenfalls widersprechen sich die meisten Angaben).

Außerdem wollten wir durch Verarbeiten eines möglichst großen Analysenmaterials unsern Untersuchungen die Sicherheit verleihen, die Eisenanalysen der Milch haben müssen, wenn man bedenkt, daß es sich um Milligramme, vielleicht nur um Bruchteile dieser, im Liter handelt.

Wir waren demnach gezwungen, so sehr dies auch wegen der Anfarbung lästig war, immer je 1 l Milch zu analysieren, weil nur auf diese Weise jede Umrechnung und die damit verbundenen Fehler zu umgehen waren.

Um von vornherein jede auch noch so kleine Verunreinigung ganz auszuschließen, untersuchten wir zunächst direkt ins Glas gemolkene Milch. Das Melken geschah unter unserer Aufsicht. Da das K. A. V.-H. über einen eigenen Musterstall verfügt, machte uns dies gar keine Schwierigkeiten, und wir konnten unter Einhaltung sämtlicher Vorsichtsmaßregeln eine mit großer Reinlichkeit gewonnene Milch untersuchen.

Das Resultat war überraschend. Nicht nur, daß die Werte, die wir pro Liter gefunden haben, sehr klein waren, sie waren

---

<sup>1)</sup> Lachs und Friedenthal, Die Bestimmung des Eisens auf colorimetrischem Wege. Diese Zeitschr. 32, 130, 1911.

alle noch viel geringer als die kleinsten bis jetzt bekannten Zahlen.

Wir vermuteten nun, und wie es sich zeigen wird mit Recht, daß die Art der Entnahme der Milch für die Analyse von nicht zu unterschätzender Bedeutung sei. Um uns darüber Klarheit zu schaffen, untersuchten wir verschiedene unter verschiedenen Bedingungen gewonnene Milchproben.

Schon die Mischmilch des K. A. V.-H.-Stalles zeigte einen höheren Gehalt. Noch größer waren die Werte bei der Mischmilch von der Molkerei Bolle und bei der Marktmilch verschiedener Provenienz, meistens aus kleinen Milchgeschäften, „Milchkellern“.

Auch von den Kühen der Meierei Bolle und der Milchanstalt Viktoriapark<sup>1)</sup> ließen wir unter unserer Aufsicht Milch direkt ins Glas melken und analysierten dieselbe.

Auch hier zeigte sich, daß direkt ins Glas gemolkene Milch den kleinsten Eisengehalt aufweist, und zwar zwischen 0,4 bis 0,7 mg Fe, im Mittel 0,5 mg Fe pro Liter.

Mischmilch und Marktmilch enthält nach unseren Analysen von 0,7 bis 1,5 mg, und zwar so, daß der Eisengehalt einer Milch derselben Provenienz ziemlich konstant bleibt, wie das weiter unten die Analysenbelege zeigen werden.

Offenbar hängt der verschiedene Eisengehalt aufs innigste mit der Behandlung der Milch zusammen, die sie während der mannigfaltigen Prozeduren erfährt. Wir wissen ja, daß die Milch in Blechgefäßen aufgefangen, daß sie einer Kühlung unterworfen wird und zuletzt aus großen emaillierten Eisengefäßen zur Auffüllung in Flaschen kommt.

Sind nun diese Gefäße an manchen Stellen etwas schadhaft geworden, so daß sich Eisenrost angesetzt hat, so ist schon hiermit eine Möglichkeit gegeben, den Eisengehalt der Kuhmilch anzureichern. Diese Anreicherung braucht nur ganz gering zu sein, um bei den minimalen Mengen, um die es sich hier handelt, deutliche Ausschläge zu geben.

Wir können dies an einem Beispiel am besten beleuchten.

Eine direkt ins Glas gemolkene Probe Milch enthielt 0,35 Fe pro Liter.

<sup>1)</sup> Wir danken an dieser Stelle bestens den Direktionen der oben erwähnten Milchmeiereien für ihr freundliches Entgegenkommen.



Ließen wir nun von derselben Kuh die Milch mittels einer Melkmaschine entnehmen, wie sie in der Milchanstalt Viktoria-park zur Anwendung gelangt, so fanden wir in derselben Milch 1,2 mg. Es ist natürlich damit nicht gesagt, daß nun die ganze Mischmilch, die durch Melkmaschinen gewonnen wird, wieder 1,2 mg pro Liter enthält; ja, sie kann sogar auch weniger enthalten, weil die hier in Betracht kommende Eisenquelle keine regelmäßig wiederkehrende ist. Im Gegenteil, es wird wahrscheinlich durch die erste Füllung die ganze in der Milchmaschine vorhandene Eisenmenge weggespült, und diese Quantität verteilt sich dann beim Mischen mit anderen Füllungen, so daß schließlich kleinere Mittelwerte gefunden werden können.

Da wir die eben erwähnte Untersuchung mittels der Lachs-Friedenthalschen Methode ausgeführt haben und wir die Zuverlässigkeit der letzteren noch nicht ohne Vorbehalt anerkennen können, so führen wir dieses Beispiel nur mit aller Vorsicht an.

Immerhin zeigt es uns, wie auf einem von den vielen Wegen Eisen in die Milch gelangen kann.

Freilich, welcher Art im chemischen Sinne die Anreicherung oder „Verunreinigung“ ist, mögen wir nicht entscheiden. Es kann sich entweder um ein mechanisches Mitreißen handeln oder um einen Lösungsvorgang.

Den letzteren könnte man sich erklären, wenn man Eisenrost als  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  auffaßt, was aber nicht ganz zutrifft.  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  ist in Wasser unlöslich, aber es ist nicht ausgeschlossen, daß die Milch, die immer etwas säurehaltig ist (Citronensäure, Milchsäure), imstande ist, das Eisenhydroxyd zu lösen.

Wir wollen noch darauf hinweisen, daß auch mit dem Wasser, das zum Spülen der Gefäße usw. benutzt wird, und das, wenn auch selten, geringe Mengen kohlen-saures oder humus-saures Eisenoxydul gelöst enthält, Eisen in die Milch gelangen kann<sup>1)</sup>.

Was als sicher aus unseren Untersuchungen hervorgeht, ist, daß Mischmilch höhere Werte aufweist, als direkt ins Glas gemolkene Milch. Der Eisengehalt der letzteren ist sehr klein.

---

<sup>1)</sup> Siehe Kooper, Ein neuer Apparat zur Prüfung des Wassers. Milch-wirtsch. Centralbl. 7, 445, 1911.

Berücksichtigt man, daß sich bei jeder Eisenanalyse eher ein Plusfehler einschleicht, so bleibt für 1 l Kuhmilch eine fast verschwindende Menge Eisen.

Für die Frauenmilch haben Camerer und Söldner<sup>1)</sup> und später Bahrdt und Edelstein<sup>2)</sup> von großer Untersuchungsmenge ausgehend (800 bis 1000 ccm), einen Durchschnittsgehalt von 1,4 bis 1,9 mg Eisen im Liter gefunden. Im Vergleich zu diesen Werten ist der Eisengehalt der Kuhmilch nach unseren Analysen etwa  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{2}$  mal kleiner.

#### Methodik.

Zur Bestimmung des Eisengehaltes wurde das Neumannsche jodometrische Verfahren benutzt. Es ist doch zweifellos das genaueste und zuverlässigste. Da aber das Eindampfen von 1 l Milch im Kjeldahlkolben mit Schwierigkeiten verknüpft ist (das Stoßen und Schäumen ist trotz vieler Vorsichtsmaßregeln oft nicht zu vermeiden), so haben wir vielfach die Milch zunächst in einer Platin- oder Silberschale in kleineren Portionen eingedampft, unter vorsichtigem Erhitzen trocken verascht, wieder mit Milch aufgefüllt usw., bis ein ganzer Liter eingedampft und verascht war. Die Asche wurde in heißem Wasser und wenig verdünnter Salzsäure gelöst, in ein Becherglas übergespült, mit einigen Tropfen Salpetersäure oxydiert, in einen Kjeldahlkolben hineinfltriert und mit heißem Wasser so lange nachgewaschen, bis ein Tropfen des Filtrates keine Spur von Eisenreaktion mehr gab.

Diese Lösung wurde unter Zugabe von 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure genau so behandelt, wie die Neumannsche Veraschungsflüssigkeit.

Mit Ausnahme von zwei Proben, einer Marktmilch und einer Mischmilch (in beiden vermuteten wir größere Eisenmengen), wurden vor der Fällung des Zinkammoniumphosphats 10 ccm einer bekannten Eisenchloridlösung zugegeben.

Nach Angaben von Neumann<sup>3)</sup> soll man in schwach saurer Lösung und unter Zugabe von 1 g Jodkalium das Jod abscheiden.

---

<sup>1)</sup> Camerer und Söldner, Zeitschr. f. Biol. 39, 190, 1900; 44, 66, 1903; 46, 371, 1905.

<sup>2)</sup> Bahrdt und Edelstein, Zeitschr. f. Kinderheilk. 1, 182, 1910.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seyler, Handb. d. physiol. u. pathol.-chem. Analyse 1909.

Traedwell<sup>1)</sup> empfiehlt eine möglichst neutrale Lösung und einen Überschuß an Jodkalium (die Reaktion  $2\text{FeCl}_2 + 2\text{KJ} \rightleftharpoons 2\text{FeCl}_3 + 2\text{KCl} + \text{J}_2$  ist reversibel).

Neumann titriert bei einer Temperatur von 50 bis 60°, Traedwell in der Kälte. Fresenius<sup>2)</sup> empfiehlt, in der Wärme das Jod zur Abscheidung zu bringen und in der Kälte zu titrieren.

Wir haben entweder in der Wärme oder in der Kälte titriert. Letzteres führten wir so aus, daß wir aus der salzsauren Lösung, die sich in einem Erlenmeyerkolben mit eingeschliffenem Stöpsel befand, die Luft durch Kohlensäure ausgetrieben haben. Dann gaben wir Jodkalium zu und erwärmten unter dichtigem Verschuß des Kolbens in einem Wasserbad auf 50 bis 60° und ließen erkalten. Erst jetzt wurde das Jod unter Anwendung von Stärke mit Natriumthiosulfat zurücktitriert.

Nach unserer Erfahrung gelingt die Abscheidung des Jods am besten nach Zugabe von 6 g Jodkalium und 2 bis 3 ccm ca. 6-n-Salzsäure und bei 300 ccm Flüssigkeitsmenge.

Bei der Feststellung des Titers haben wir natürlich dieselben Bedingungen eingehalten, auch bezüglich der Verdünnung.

Wir haben wegen des interessanten Vergleiches auch die colorimetrische Methode von Lachs und Friedenthal angewandt. Ausschließlich mit dieser Methode wurden die direkt ins Glas gemolkenen Proben aus der Meierei Bolle und der Milchanstalt Viktoriapark analysiert<sup>3)</sup>. Wir haben uns auf diese Weise die Untersuchung erleichtert und an Zeit gewonnen (eine Untersuchung nach Neumann dauert, wenn die Milch im Kolben eingedampft wird, mindestens 3 Wochen, engt man sie dagegen in einer Platin- oder Silberschale ein, mindestens eine Woche), ohne die Zuverlässigkeit preiszugeben, weil die entscheidenden Analysen nach Neumann bestimmt wurden.

Nach Lachs und Friedenthal arbeitet man folgendermaßen: Man dampft 5 ccm Milch in einer Platinschale ein, verascht sie, nimmt die Asche mit 1 ccm Wasser und 1 ccm 6-n-Salzsäure auf, versetzt mit 1 ccm konzentrierter Rhodankaliumlösung und schüttelt das Ganze mit

---

<sup>1)</sup> Traedwell, Lehrb. d. anal. Chem. 2, 522, 1907.

<sup>2)</sup> Fresenius, Quantit. Analyse 1, 292, 1903.

<sup>3)</sup> Es wurden jeder Kuh durchschnittlich 300 bis 400 ccm entnommen.

1 ccm Äther aus. Die Ätherschicht nimmt dabei eine schöne rote Farbe an (das in Äther lösliche, undissoziierte Ferrirhodanid), die man mit der Farbenskala vergleicht. Diese stellt man sich her, indem man aus einer Lösung, die in 1 ccm  $10^{-4}$  Fe<sup>+++</sup> bzw.  $10^{-5}$  Fe<sup>+++</sup> enthält, in eine Reihe Reagensgläser 1 bzw. 0,8 bzw. 0,5 usw. ccm überträgt. Diese Lösungen füllt man bis auf 1 ccm mit Wasser auf, fügt zu jeder Lösung 1 ccm eisenfreier 6-n-Salzsäure und 1 ccm konzentrierter Rhodankaliumlösung zu und schüttelt mit je 1 ccm Äther um.

Wir gebrauchten meistens nur die zweite Reihe zum Vergleich.

Über die Methode und ihre Zuverlässigkeit ist folgendes zu sagen: Zunächst der Fehler, daß man das Resultat mit 200 multiplizieren muß. Gewiß, die Reaktion ist sehr scharf; aber wo es sich um individuelle Unterscheidung der Farbtönen handelt, ist besonders bei einem höheren Eisengehalt ein, wenn auch ganz geringer, Fehler kaum zu vermeiden, der nun um das 200fache vergrößert wird.

Bei einem Eisengehalt von über 1,5 mg lassen sich die Farbenunterschiede nicht mehr genau erkennen, so daß für solche Analysen das Verfahren kaum anwendbar sein dürfte. Handelt es sich aber um kleine Werte, zwischen 0,3 und 0,7, und bewegen sich die Resultate nach der Multiplikation in diesen Grenzen, so kann man mit größter Wahrscheinlichkeit die Analyse als richtig annehmen; denn Verlustfehler sind fast ausgeschlossen, und jede Zahl bei einer Eisenbestimmung ist eher zu hoch als zu niedrig anzusehen. An Bequemlichkeit, Eleganz und Kürze der Ausführung läßt die Methode nichts zu wünschen übrig.

Wir lassen nun die Analysenbelege folgen, und zwar in Tabellen zusammengestellt. Tabelle I enthält Analysen der direkt ins Glas gemolkenen Milch vom Stall des K. A. V.-H. Tabelle II gibt die Resultate über die Mischmilch vom K. A. V.-H. Tabelle III die Eisenwerte der Mischmilch von Bolle und einer Marktmilch. Dann folgen die Analysen der direkt ins Glas gemolkenen Milch von Bolle und der Milchanstalt Viktoriapark, ausgeführt nach der Methode von Lachs und Friedenthal. Wir haben die colorimetrische Bestimmung immer mit zwei Proben derselben Milch ausgeführt. Differierten die beiden Resultate, so haben wir aus beiden einen Mittelwert berechnet. Dies ist in der Zusammenstellung mit einem \* bezeichnet.

Tabelle I.

Her- kunft	Art der Ent- nahme	Art der Verarbeitung	Titer und Gebrauch an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Ver- brauch an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	In 1000 ccm Milch mg Fe	Nach Lachs- u. Frieden- thal in 1000 ccm Milch mg Fe	Bemerkungen	
1.	Stall des K. A. V.-H.	Direkt ins Glas gemolken	In einer Silberschale eingedampft	$\frac{2 \text{ mg Fe} = 9,1 \text{ ccm ca. } \frac{1}{100} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}{10,3}$	$\frac{10,3}{1,2} - 9,1$	0,263	0,3	
2.			Silberschale	9,3 11,2	1,9	0,40	0,45	
3.			Platinschale	10,25 12,95	2,7	0,45	0,5	kalt titriert
4.			Silberschale	9,3 11,1	1,8	0,387	0,45	
5.			Silberschale	9,65 13,0	3,35	0,694	1,05	
6.			Silberschale	9,65 12,85	3,2	0,663	1,05	
7.			Im Kjeldahl- kolben ein- gedampft und verascht	15,05 17,15	2,1	0,27	0,45	kalt titriert

Tabelle II.

Her- kunft	Art der Ent- nahme	Art der Verarbeitung	Titer und Gebrauch an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Ver- brauch an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	In 1000 ccm Milch mg Fe	Nach Lachs- u. Frieden- thal in 1000 ccm Milch mg Fe	Bemerkungen	
8.	Stall des K. A. V.-H.	Mischmilch	Im Kjeldahl- kolben ein- gedampft und verascht	8,65 4,0	4,0	0,92	—	Keine Zugabe von Eisenchlorid
9.			In einer Silberschale eingedampft	9,2 12,15	2,95	0,64	0,45	
10.			Silberschale	9,15 13,75	4,6	1,005	—	
11.			Platinschale	9,2 14,15	4,95	1,07	—	

Tabelle III.

Herkunft	Art der Entnahme	Art der Verarbeitung	Titer und Gebrauch an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Verbrauch an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	In 1000 ccm Milch mg Fe	Nach Lachs u. Friedenthal in 1000 ccm Milch mg Fe	Bemerkungen
Bolle	Mischmilch	In einer Silberschale eingedampft	9,15 14,95	5,8	1,26	1,1	
		Silberschale	9,4 24,1	5,3	1,12	—	20 ccm Eisenchloridzugabe
		Silberschale	9,4 26,0	7,2	1,53	—	20 ccm Eisenchloridzugabe
		Silberschale 2 l Milch	9,3 20,15	10,85	1,16	0,9	
		Kolben	9,3 14,7	5,4	1,15	0,9	Dieselbe Milch wie die in der Silberschale verdampften 2 l
Marktmilch		Kolben	15,5 25,0	9,5	1,22	—	kalt titriert

Direkt ins Glas gemolkene Milch von der Milchanstalt Viktoriapark. Analysiert nach Lachs und Friedenthal.

Direkt ins Glas gemolkene Milch aus der Meierei Bolle. Analysiert nach der colorimetrischen Methode von Lachs und Friedenthal.

	Färbung entsprach in mg	Fe pro 1000 ccm in mg		Färbung entsprach in mg	Fe pro 1000 ccm in mg
1.	0,00125	0,25	1.	0,0020	0,4
2.	0,0025	0,5	2.	0,0032	0,65*
3.	0,0025	0,5	3.	0,0022	0,45*
4.	0,0017*	0,35	4.	0,0017	0,35*
5.	0,0035	0,7	5.	0,0050	1,0
6.	0,0030	0,6	6.	0,0017	0,35
7.	0,0020	0,4	7.	0,0022	0,45*
8.	0,0035	0,7	8.	0,0020	0,4
9.	0,0035	0,7	9.	0,0025	0,5*
10.	0,0060	1,2			

Zusammenfassung.

- Direkt ins Glas gemolkene Kuhmilch enthält 0,4 bis 0,7, im Mittel 0,5 mg Fe im Liter.
- Der Eisengehalt der Kuhmilch ist geringer als der der Frauenmilch. Er ist etwa  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{2}$  mal kleiner.
- Der jeweilige Eisengehalt der Kuhmilch hängt von der Behandlung der Milch (im Molkereibetrieb usw.) und der Art der Entnahme ab. Nur so lassen sich die großen Differenzen in der Literatur erklären. Es handelte sich eben in jedem einzelnen Falle je nach der Behandlung, die die Milch erfahren hat, um eine eisenreichere oder eisenärmere Milch.

# Über den Einfluß des Adrenalins auf den Gaswechsel.

Von  
Paul Hári.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest,  
Direktor: Franz Tangl.)

*(Eingegangen am 10. November 1911.)*

(Nach teilweise in Gemeinschaft mit Ludwig Lévi  
ausgeführten Versuchen.)

Nach den grundlegenden Versuchen von Oliver und Schäfer<sup>1)</sup> über die physiologische Wirkung des Nebennierenextraktes und dem weiteren Ausbau dieser Lehre durch Langley<sup>2)</sup> und andere war es Blums<sup>3)</sup> Entdeckung der Adrenalin-glucosurie, die der Nebenniere resp. ihren Präparaten wieder erhöhtes Interesse zuwandte.

Blums Befunde wurden allseits bestätigt und man ging bald daran, den Mechanismus dieser Glucosurie zu erforschen.

Von den Ergebnissen dieser Forschung können wohl als sicher-gestellt gelten: einerseits die Abnahme des Glykogengehaltes der Leber

---

<sup>1)</sup> George Oliver und E. A. Schäfer, The physiological effects of extracts of the suprarenal capsules. Journ. of Physiol. 18, 230, 1895.

<sup>2)</sup> J. N. Langley, Action of suprarenal extract. Journ. of Physiol. 27, 237, 1901/2. Die übrige Literatur bei Swale Vincent, Innere Sekretion und Drüsen ohne Ausführungsgang. Ergebnisse d. Physiol. 9. Jahrg. 1910.

<sup>3)</sup> F. Blum, Über Nebennierendiabetes. Deutsch. Archiv f. klin. Med. 71, 146, 1901.

und Skelettmuskeln, andererseits die Zunahme des Blutzuckers unter der Einwirkung des Adrenalins, welche Erscheinungen sowohl untereinander als auch mit der Glucosurie unschwer in einen genetischen Zusammenhang gebracht werden können.

Zuelzer<sup>1)</sup> wies bereits im Jahre der Entdeckung der Adrenalin-glucosurie (1901) auf die Leber als deren wahrscheinliche Quelle hin; desgleichen konstatierte er sowie L. Metzger<sup>2)</sup> 1902 die Hyperglykämie nach Adrenalineinspritzungen.

C. A. Herter und Alfred J. Wakemann<sup>3)</sup> zitieren die von Richards schon früher angestellten Adrenalinversuche an Hunden, in deren Blute der Zuckergehalt von 0,26 auf 0,40% anstieg; sie folgerten aus diesen Versuchen, daß „die Glykogenmenge der Leber einen großen Einfluß auf den Grad der Glucosurie“ ausübt.

M. Doyon und N. Kareff<sup>4)</sup> wiesen im Jahre 1903, W. B. Drummond und D. N. Paton<sup>5)</sup> 1904, Frau Z. Gatin-Gruzewska<sup>6)</sup> 1906, K. Agadschanianz<sup>7)</sup> 1907 nach, daß nach Applikation von Adrenalin die Menge des Glykogen in der Leber, resp. auch in den Muskeln verringert ist. So fand insbesondere letztgenannter Autor in den Muskeln von vier Kontrolltieren 0,26%, resp. Spuren, resp. 0,15, resp. 0,59% Glykogen, in den Muskeln von vier mit Adrenalin behandelten Tieren keine Spur von Glykogen.

Daß dieselbe Adrenalinmenge bei subcutaner Applikation zu einer weit stärkeren Hyperglykämie als bei intravenöser Injektion führt, läßt sich nach Pollak<sup>8)</sup> daraus erklären, daß die vasoconstrictorische, daher auch schädigende Wirkung auf Leber und andere Organe bei jener Applikationsform viel milder als bei intravenöser Applikation ausfällt.

<sup>1)</sup> Zuelzer, Zur Frage des Nebennierendiabetes. Berl. klin. Wochenschr. 1901, Nr. 48, S. 1209.

<sup>2)</sup> L. Metzger, Zur Lehre vom Nebennierendiabetes. Münch. med. Wochenschr. 1902, Nr. 12, S. 478.

<sup>3)</sup> C. A. Herter und Alfred J. Wakemann, Über Adrenalin-Glucosurie und verwandte . . . Glucosurien. Virchows Archiv 169, 479, 1902

<sup>4)</sup> M. Doyon und N. Kareff, Action de l'adrenaline sur le glycogène du foie. Compt. rend. Soc. Biol. 66.

<sup>5)</sup> W. B. Drummond und D. N. Paton, Observations on the influence of adrenalin poisoning on the liver with special reference to the glycogen. Journ. of Physiol. 31, 92, 1904.

<sup>6)</sup> Z. Gatin-Gruzewska, Influence de la dilution des solutions d'adrenaline sur la disparition du glycogène dans le foie et dans le muscle. Compt. rend. Soc. Biol. 1, 940, 1906, Jahrg. 58; Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 142, 1165.

<sup>7)</sup> K. Agadschanianz, Über den Einfluß des Adrenalins auf das in Leber und Muskeln enthaltene Glykogen. Diese Zeitschr. 2, 148, 1907.

<sup>8)</sup> Leo Pollak, Experimentelle Studien über Adrenalin-Diabetes. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61, 157, 1909.



Besonders auffallend und durchaus unerklärt sind P.s Versuche, in denen „bei hungernden Kaninchen, auch solchen, die durch Strychninkrämpfe völlig glykogenfrei gemacht wurden, . . . wiederholte Zufuhr von Adrenalin in steigenden Dosen zu Glykogenaufstapelung in der Leber von einer Größe“ führte, „wie sie sonst nur bei kohlenhydratgefütterten Tieren zur Beobachtung kommt. Die Muskeln sind dabei völlig oder fast glykogenfrei“.

Heinrich Ritzmann<sup>1)</sup> hat auf indirektem Wege den Beweis erbracht, daß die Adrenalin-Glucosurie mit dem Glykogenbestand des Körpers in engem Zusammenhange steht. Er fand nämlich, daß die Konzentration der applizierten Adrenalinlösung nicht unter einen gewissen Schwellenwert sinken darf, sofern es überhaupt zu einer Glucosurie kommen soll; dieser Schwellenwert ist aber nicht konstant, sondern direkt abhängig vom Glykogenbestand des Körpers, was aus folgendem Versuch hervorgeht. R. hat zu seinem Versuch ein und dasselbe Tier (Kaninchen) a) einmal hungernd, b) ein zweites Mal normal gefüttert und c) ein drittes Mal mit Rohrzucker auf Glykogen vorgefüttert verwendet, in letzterem Falle jedoch das Verschwinden der eingetretenen alimentären Glucosurie abgewartet. Ritzmann fand, daß das Tier a) normal gefüttert, auf eine Adrenalinlösung von 1:500000 mit einer ansehnlichen Glucosurie reagiert, b) im Hungerzustande sogar nach doppelt so starken Adrenalin-Injektionen (1:250000) kaum eine Spur von Zucker im Harn hat, c) auf Glykogen vorgefüttert aber auf Adrenalin-Lösungen von 1:1000000 mit derselben Zuckermenge reagiert, wie das normal gefütterte Tier auf die Lösung von 1:500000.

Nach alledem scheint es nicht fraglich zu sein, daß die Wirkung des Adrenalins in einer Umwandlung des freien Leber- (oder Muskel-)Glykogens in kreisenden Blutzucker — von den Autoren treffend „Mobilisierung des Zuckers“ genannt — besteht; da jedoch von Zuelzer<sup>2)</sup> noch im Jahre 1908 mit Recht hervorgehoben werden kann, daß „ein Versuch . . . bisher noch nicht gemacht worden, der die Koinzidenz der blutdrucksteigernden Funktion des chromaffinen Systems und der zucker-mobilisierenden Funktion beweist“, glaube ich zu dieser letzteren Frage, sowie zu dem ganzen Problem der Adrenalinwirkung einiges durch Mitteilung mehrerer Gaswechselversuchsreihen aus dem Jahre 1906 um so eher beitragen zu können, da — außer

---

<sup>1)</sup> Heinrich Ritzmann, Über den Mechanismus der Adrenalin-glucosurie. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61, 231, 1909.

<sup>2)</sup> G. Zuelzer in Gemeinschaft mit Max Dohrn und Anton Merker, Neue Untersuchungen über den experimentellen Diabetes. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 32.

einigen Arbeiten<sup>1)</sup> über den N-Umsatz nach Adrenalin-Injektionen — meines Wissens bloß Welecki<sup>2)</sup> die Wirkungen des Adrenalins auf den Stoffwechsel untersuchte. W. fing in  $\frac{1}{2}$ stündigen Respirationsversuchen die von Hunden und Kaninchen produzierte  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  in Absorptionsgefäßen auf und fand nach intraperitonealen Injektionen eine Verminderung, nach intravenösen eine Vermehrung der  $\text{CO}_2$ -Produktion.

#### Methodik der Versuche.

Da es sich bei der Adrenalinwirkung um rasche und offenbar auch schnell vorübergehende Veränderungen im Stoffwechsel handelt, war es angezeigt, den Gaswechsel in kurzen, nach dem Zuntz-Geppertschen Prinzip angestellten Respirationsversuchen zu untersuchen, und zwar mittels der im Jahre 1906 durch Prof. Tangl bereits durchgebildeten, jedoch erst in jüngster Zeit veröffentlichten Methodik<sup>3)</sup>, mit dem einzigen Unterschiede, daß die künstliche Ventilierung der curarisierten Tiere zu jener Zeit noch mit dem Tanglschen<sup>4)</sup> Respirationshahn geschah.

Alles in allem wurden 13 Versuchsreihen an 9 Hunden angestellt; die Ausführung von zwei Versuchsreihen an einem Tier war in den Fällen möglich, wo die Versuche zeitlich am Morgen begannen und nach einer Mittagspause von mehreren Stunden mit einer zweiten Versuchsreihe noch rechtzeitig begonnen werden konnte.

In 11 von den 13 Versuchsreihen war die Dauer der Einzelversuche auf 7 bis 12 Minuten bemessen; in zweien aber (mit intravenöser Injektion) wurden in Intervallen von 2 bis

---

<sup>1)</sup> Rahel Hirsch, zitiert bei Fr. Kraus und H. Friedenthal, Über die Wirkung der Schilddrüsenstoffe. Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 38, S. 1709. — R. Quest, Über die Bedeutung der Nebennieren in der Pathologie und Therapie der Rachitis. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 5, 43, 1908.

<sup>2)</sup> St. Welecki, Studien über den Einfluß des Adrenalins auf die  $\text{CO}_2$ -Wasserausscheidung. Bull. de l'Acad. d. Sc. Cracovie 1909.

<sup>3)</sup> F. Tangl, Die Arbeit der Nieren und die spezifisch-dynamische Wirkung der Nährstoffe. Diese Zeitschr. 34, 1.

<sup>4)</sup> F. Tangl, Beschreibung eines Apparates zu quantitativen Respirationsversuchen mit künstlicher Atmung. Arch. f. d. ges. Physiol. 98, 588, 1903.

4 Minuten Versuche von 50 bis 55 Sekunden Dauer ausgeführt, um einen genaueren Einblick in den zeitlichen Ablauf der durch das Adrenalin gesetzten Veränderungen im Gaswechsel zu ermöglichen.

Alle Hunde hatten 24 bis 36 Stunden lang vor Beginn der Versuche gehungert.

In jeder Versuchsreihe wurde zunächst in einer Reihe von Versuchen der Gaswechsel des curarisierten Tieres vor der Adrenalin-Injektion festgestellt; sodann erhielt das Tier

a) in den Versuchsreihen I bis VI mehrere Kubikzentimeter einer 1‰igen (käuflichen) Lösung von Adrenalin auf einmal in die Bauchhöhle injiziert, worauf das Ansteigen des Blutdruckes alsbald begann und die Respirationsversuche wieder aufgenommen wurden, so daß der Gaswechsel der ersten Viertelstunde nach der Adrenalineinspritzung bereits in den Bereich der Untersuchung gezogen werden konnte; in einigen Versuchsreihen sind eben die unmittelbar nach den Adrenalin-Injektionen vorgenommenen Gasanalysen verunglückt, so daß es bei der Betrachtung der betreffenden Tabellen den Anschein hat, als sei hier mit den Analysen erst viel später begonnen worden.

b) In den Versuchsreihen VII bis XIII wurden dem Tier nach den entsprechenden Gaswechsel-Vorversuchen zunächst 1 ccm, enthaltend 1 mg Adrenalin, in die Vena jugularis eingespritzt, worauf der Blutdruck fast sofort anstieg. Gleich darauf wurde mit einem Respirationsversuch begonnen, und, um für die ganze Dauer dieses Respirationsversuches annähernd konstante Verhältnisse zu schaffen, die Adrenalin-Einspritzungen bis zum Schluß dieses Respirationsversuchs in Intervallen von je einigen Minuten immer wiederholt, sobald der Blutdruck zu sinken begann.

Die Ergebnisse aller Versuche sind aus den Tabellen I bis X ersichtlich.

Tabelle I.

Nummer des Versuchstieres: A. Körpergewicht: 4200 g. Datum: 27. III. 1906.

Versuchsreihe	Nr.	Anfang	Dauer	Atemvolum pro Minute	O <sub>2</sub> -Abnahme	CO <sub>2</sub> -Zunahme	O <sub>2</sub> -Verbrauch	CO <sub>2</sub> -Ausgabe	CO <sub>2</sub> / O <sub>2</sub>	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuchs	Blutdruck mm Hg	Anmerkungen
					in der Ventilationsluft		pro Minute					
					ccm	%	%	ccm				
I.	1	9 <sup>h</sup> 46'	12' 36"	1390	2,77	2,22	38,44	30,80	0,801	38,4 38,7	140	} Harn zuckerfrei.
	2	10 <sup>h</sup> 22'	11' 54"	1449	2,61	2,11	37,67	30,42	0,807	39,5 39,6	127	
	3	12 <sup>h</sup> 9'	10' 59"	1442	2,34	1,94	33,72	27,97	0,829	39,5 39,6	180	Um 10 <sup>h</sup> 53' wurden 0,004 g Adrenalin in die Bauchhöhle injiziert.
	4	12 <sup>h</sup> 48'	11' 45"	1412	2,29	1,99	32,31	28,08	0,869	39,4 39,5	180	Im Harn von Versuch 4 Spuren von Zucker.
Versuchspause												
II.	5	3 <sup>h</sup> 26'	11' 47"	1422	2,37	2,12	33,76	30,08	0,891	39,7 39,7	154	
	6	3 <sup>h</sup> 52'	12' 48"	1272	2,66	2,11	35,03	27,77	0,793	?	147	
	7	4 <sup>h</sup> 43'	12' 0"	1356	2,43	1,92	33,01	26,05	0,789	?	100	Um 4 <sup>h</sup> 30' werden 0,004 g Adrenalin in die Bauchhöhle injiziert.
	8	5 <sup>h</sup> 20'	12' 32"	1286	2,45	2,07	32,33	27,21	0,842	?	155	} Harn zuckerfrei.
	9	5 <sup>h</sup> 53'	14' 2"	1209	2,63	2,06	31,48	24,26	0,762	37,0 37,0	110	

Tabelle II.

Nummer des Versuchstieres: B. Körpergewicht: 6250 g. Datum: 30. III. 1906.

Versuchsreihe	Nr.	Anfang	Dauer	Atemvolum pro Minute	O <sub>2</sub> -Abnahme	CO <sub>2</sub> -Zunahme	O <sub>2</sub> -Verbrauch	CO <sub>2</sub> -Ausgabe	CO <sub>2</sub> / O <sub>2</sub>	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuchs	Blutdruck mm Hg	Anmerkungen
					in der Ventilationsluft		pro Minute					
					ccm	%	%	ccm				
III.	1	9 <sup>h</sup> 9'	9' 13"	1900	2,77	2,23	60,55	49,35	0,815	37,8 37,8	188	} Kein Harn.
	2	9 <sup>h</sup> 59'	9' 1"	1796	3,27	2,61	58,66	47,47	0,810	38,2 38,3	127	
	3	11 <sup>h</sup> 22'	8' 51"	1807	3,14	2,82	56,69	50,90	0,848	38,0 38,0	218	Um 10 <sup>h</sup> 36' werden 0,004 g Adrenalin in die Bauchhöhle injiziert.
	4	12 <sup>h</sup> 30'	8' 50"	1902	2,86	2,69	56,17	52,86	0,941	37,5 37,5	200	} Kein Harn.
	5	1 <sup>h</sup> 3'	8' 2"	2126	2,78	2,48	59,16	52,70	0,891	38,0 38,0	215	
	6	3 <sup>h</sup> 18'	12' 0"	1753	3,25	2,77	57,03	48,56	0,852	38,6 —	—	

Tabelle III.

Nummer des Versuchstieres: C. Körpergewicht: 5700 g.

Datum: 19. IV. 1906.

Ver- suchs- reihe	Nr.	An- fang	Dauer	Atemvolum pro Minute ccm	O <sub>2</sub> -Ab- nahme	CO <sub>2</sub> -Zu- nahme	O <sub>2</sub> -Ver- brauch	CO <sub>2</sub> - Ausgabe	CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuchs	Blut- druck mm Hg	Anmerkungen
					in der Ven- tilationsluft		pro Minute					
	%	%	ccm		ccm							
IV.	1	9 <sup>h</sup> 32'	12' 7"	1359	3,06	2,62	41,67	35,66	0,856	36,9 36,9	225	} Harnbefund fehlt
	2	9 <sup>h</sup> 58'	12' 52"	1284	3,00	2,63	38,48	33,72	0,876	37,0 36,9	218	
	3	10 <sup>h</sup> 26'	12' 6"	1335	2,80	2,68	37,40	35,77	0,956	36,9 37,0	225	
	4	11 <sup>h</sup> 10'	14' 5"	1233	3,33	2,72	41,12	33,48	0,814	36,8 —	—	
	5	12 <sup>h</sup> 37'	13' 35"	1277	2,61	2,46	33,33	31,44	0,943	36,0 36,0	Mano- meter verdorben	Um 12 <sup>h</sup> 33' werden 0,003 g Adrenalin in die Bauch- höhle injiziert.
	6	1 <sup>h</sup> 0'	13' 36"	1217	2,91	2,62	35,45	31,91	0,900	35,9 35,6		Harnbefund fehlt.

Tabelle IV.

Nummer des Versuchstieres: D. Körpergewicht: 5600 g.

Datum: 23. IV. 1906.

Ver- suchs- reihe	Nr.	An- fang	Dauer	Atemvolum pro Minute ccm	O <sub>2</sub> -Ab- nahme	CO <sub>2</sub> -Zu- nahme	O <sub>2</sub> -Ver- brauch	CO <sub>2</sub> - Ausgabe	CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuchs	Blut- druck mm Hg	Anmerkungen
					in der Ven- tilationsluft		pro Minute					
	%	%	ccm		ccm							
V.	1	9 <sup>h</sup> 40'	9' 57"	1667	3,26	2,64	54,30	43,95	0,809	38,3 38,4	132	} Harn zuckerfrei.
	2	10 <sup>h</sup> 11'	9' 44"	1739	3,04	2,54	52,92	44,16	0,834	38,5 38,6	175	
	3	10 <sup>h</sup> 48'	10' 59"	1632	3,15	2,59	51,45	42,34	0,823	38,5 38,6	165	Um 10 <sup>h</sup> 38' werden 0,005 g Adrenalin in die Bauch- höhle injiziert.
	4	11 <sup>h</sup> 25'	10' 40"	1613	3,05	2,66	49,17	42,98	0,874	38,6 38,6	172	} Harn zuckerfrei.
	5	12 <sup>h</sup> 1'	10' 30"	1625	2,94	2,59	47,86	42,09	0,881	38,7 38,7	180	
	6	12 <sup>h</sup> 35'	10' 38"	1576	3,06	2,66	48,28	41,85	0,867	39,0 39,0	180	

Tabelle V.

Nummer des Versuchstieres: H. Körpergewicht: 7000 g. Datum: 15. V. 1906.

Versuchsreihe	Nr.	Anfang	Dauer	Atemvolum pro Minute	O <sub>2</sub> -Abnahme	CO <sub>2</sub> -Zunahme	O <sub>2</sub> -Verbrauch	CO <sub>2</sub> -Ausgabe	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuchs	Blutdruck	Anmerkungen		
					in der Ventilationsluft								pro Minute	
					ccm	%							ccm	ccm
VI.	8	4 <sup>h</sup> 9'	6' 4"	2820	2,29	1,77	64,61	49,92	0,779	39,2 39,2	130	Fortsetzung der Versuchsreihe XII am selben Tiere nach der Mittagspause. Um 4 <sup>h</sup> 45' werden 0,007 g Adrenalin in die Bauchhöhle injiziert. Harn zuckerfrei.		
	9	4 <sup>h</sup> 51'	5' 46"	2736	2,20	1,78	60,12	48,79	0,812	39,2 39,1	150			
	10	5 <sup>h</sup> 9'	6' 11"	2714	2,17	1,78	59,04	48,29	0,818	39,0 39,0	180			
	11	5 <sup>h</sup> 38'	6' 18"	2699	2,19	1,85	59,21	49,92	0,843	39,0 39,0	180			

Tabelle VI.

Nummer des Versuchstieres: E. Körpergewicht: 4500 g. Datum: 24. IV. 1906.

Versuchsreihe	Nr.	Anfang	Dauer	Atemvolum pro Minute	O <sub>2</sub> -Abnahme	CO <sub>2</sub> -Zunahme	O <sub>2</sub> -Verbrauch	CO <sub>2</sub> -Ausgabe	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuchs	Blutdruck	Anmerkungen		
					in der Ventilationsluft								pro Minute	
					ccm	%							ccm	ccm
VII.	1	9 <sup>h</sup> 12'	9' 30"	1678	2,48	1,95	41,65	32,71	0,785	37,9 38,2	125	Harn am 23. IV. zuckerfrei. Harn v. d. Versuchen 1 bis 3 enthält 1,4% Zucker.		
	2	9 <sup>h</sup> 41'	10' 15"	1601	2,67	2,07	42,68	33,17	0,777	38,3 38,4	110			
	3	10 <sup>h</sup> 10'	11' 46"	1535	2,67	2,22	40,92	34,10	0,833	38,5 38,5	96			
	4	11 <sup>h</sup> 11'	9' 28"	1579	2,28	2,29	35,97	36,18	1,006	38,1 38,1	245-90	Von 11 <sup>h</sup> 5' bis 11 <sup>h</sup> 15' werden 3 mal 0,001 g Adrenalin in die Vena jugul. injiziert. Harn zuckerfrei.		
	5	11 <sup>h</sup> 42'	10' 14"	1557	2,54	2,14	39,58	33,34	0,842	38,5 38,6	120			
	6	12 <sup>h</sup> 17'	10' 40"	1540	2,33	2,11	35,91	32,45	0,903	38,7 38,7	110			
	7	12 <sup>h</sup> 50'	9' 49"	1561	2,08	1,93	32,40	30,09	0,929	38,7 38,7	88			
Versuchspause														
VIII.	8	4 <sup>h</sup> 32'	9' 51"	1654	2,07	1,82	34,31	30,09	0,877	38,1 —	120	Harn zuckerfrei.		
	9	5 <sup>h</sup> 5'	9' 35"	1672	2,05	1,78	34,24	29,81	0,871	38,2 38,3	120			
	10	5 <sup>h</sup> 53'	9' 59"	1607	1,87	1,78	30,10	28,68	0,953	38,0 38,0	210-100	Von 5 <sup>h</sup> 37' bis 6 <sup>h</sup> 5' werden 7 mal 0,001 g Adrenalin in die Vena jugul. injiziert. Harn zuckerfrei.		
	11	6 <sup>h</sup> 31'	10' 49"	1449	2,22	1,90	33,51	28,56	0,857	37,8 37,9	75			
	12	6 <sup>h</sup> 58'	10' 59"	1507	2,21	1,81	33,35	27,77	0,818	37,8 37,8	90			

Tabelle VII.

Nummer des Versuchstieres: F. Körpergewicht: 4900 g. Datum: 28. IV. 1906.

Versuchsreihe	Nr.	Anfang	Dauer	Atemvolum pro Minute	O <sub>2</sub> -Abnahme	CO <sub>2</sub> -Zunahme	O <sub>2</sub> -Verbrauch	CO <sub>2</sub> -Ausgabe	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuchs	Blutdruck	Anmerkungen
					in der Ventilationsluft		pro Minute					
					ccm	%	%	ccm				
IX.	1	9 <sup>h</sup> 59'	9' 1"	1813	2,31	1,84	41,96	33,28	0,793	38,0 38,3	160	Harn zuckerfrei.
	2	10 <sup>h</sup> 21'	8' 55"	1882	2,27	1,84	42,69	34,60	0,810	38,2 38,0	160	
	3	10 <sup>h</sup> 49'	8' 42"	1849	2,34	1,86	43,29	34,36	0,794	38,0 38,0	165	
	4	11 <sup>h</sup> 36'	8' 50"	1798	2,46	2,19	44,27	39,41	0,890	38,2 38,0	180—260	Von 11 <sup>h</sup> 29' b. 11 <sup>h</sup> 42' werden 0,005g Adrenalin in 6 Dos. in d. Vena jugul. injiziert.
	5	11 <sup>h</sup> 56'	8' 15"	1875	2,49	2,14	45,76	40,14	0,877	38,0 38,3	116	
	6	12 <sup>h</sup> 39'	8' 46"	1900	1,95	1,75	37,07	33,24	0,896	38,0 37,8	90	
Versuchspause												
X.	7	3 <sup>h</sup> 9'	9' 30"	1721	2,65	2,28	45,55	39,25	0,862	38,4 38,6	135	Harn zuckerfrei.
	8	3 <sup>h</sup> 58'	8' 32"	1790	2,45	2,14	42,68	37,22	0,872	38,0 37,8	120	
	9	4 <sup>h</sup> 25'	9' 30"	1750	2,58	2,19	45,09	38,28	0,849	37,8 37,9	120	
	10	5 <sup>h</sup> 18'	10' 0"	1701	2,24	2,04	38,10	34,63	0,909	38,0 38,0	120—210	Von 5 <sup>h</sup> 9' bis 5 <sup>h</sup> 27' werden 0,006g Adrenalin in 8 Dos. in d. Vena jugul. injiziert.
	11	5 <sup>h</sup> 45'	9' 12"	1746	2,41	2,26	42,06	39,55	0,940	37,9 37,9	60	
	12	6 <sup>h</sup> 12'	9' 53"	1691	2,38	2,13	40,26	36,07	0,897	37,8 37,7	75	

Tabelle VIII.

Nummer des Versuchstieres: G. Körpergewicht: 4300 g. Datum: 3. V. 1906.

Versuchsreihe	Nr.	Anfang	Dauer	Atemvolum pro Minute	O <sub>2</sub> -Abnahme	CO <sub>2</sub> -Zunahme	O <sub>2</sub> -Verbrauch	CO <sub>2</sub> -Ausgabe	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuchs	Blutdruck	Anmerkungen
					in der Ventilationsluft		pro Minute					
					ccm	%	%	ccm				
XI.	1	10 <sup>h</sup> 4'	10' 34"	1607	2,95	2,53	47,35	40,71	0,877	37,5 37,5	125	Harn zuckerfrei.
	2	10 <sup>h</sup> 31'	10' 44"	1590	3,02	2,70	48,10	43,00	0,860	37,4 37,7	132	
	3	11 <sup>h</sup> 2'	11' 22"	1548	3,05	2,78	47,28	42,99	0,894	37,7 37,7	125	
	4	11 <sup>h</sup> 33'	11' 15"	1483	2,24	2,30	33,19	34,07	1,026	37,0 37,0	125—250	Von 11 <sup>h</sup> 24' b. 11 <sup>h</sup> 41' werden 0,006g Adrenalin in 5 Dos. in d. Vena jugul. injiziert.
	5	12 <sup>h</sup> 2'	10' 23"	1558	3,16	3,23	49,22	50,33	1,022	37,0 37,2	160	

Tabelle IX.

Nummer des Versuchstieres: H. Körpergewicht: 7000 g. Datum: 15. V. 1906.

Ver- suchs- reihe	Nr.	An- fang	Dauer	Atemvolum pro Minute	O <sub>2</sub> -Ab- nahme	CO <sub>2</sub> -Zu- nahme	O <sub>2</sub> -Ver- brauch	CO <sub>2</sub> - Ausgabe	CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuchs	Blut- druck mm Hg	Anmerkungen
					in der Ven- tilationsluft		pro Minute					
					ccm	%	%	ccm				
XII.	1	10 <sup>h</sup> 56'	5' 52"	2921	2,09	1,95	61,08	56,96	0,933	39,1 39,1	170	} Harn zuckerfrei.
	2	11 <sup>h</sup> 12'	5' 41"	2894	2,15	1,88	62,16	54,34	0,874	39,0 38,9	155	
	3	11 <sup>h</sup> 52'	0' 45"	2897	2,26	1,73	63,68	50,21	0,788	39,0 —	300	} Um 11 <sup>h</sup> 51' werden 0,0045 g Adrenalin in die Vena jugularis eingespritzt.
	4	11 <sup>h</sup> 58'	0' 45"	2897	1,93	1,77	55,97	51,19	0,915	— —	140	
	5	12 <sup>h</sup> 4'	0' 40"	2897	1,63	1,37	47,14	39,69	0,842	— —	300	
	6	12 <sup>h</sup> 8'	0' 45"	2897	2,40	1,98	69,56	58,10	0,835	— —	120	
	7	12 <sup>h</sup> 17'	0' 45"	2897	2,48	2,09	71,85	60,58	0,843	— 39,5	—	

Tabelle X.

Nummer des Versuchstieres: J. Körpergewicht: 5200 g. Datum: 17. V. 1906.

Ver- suchs- reihe	Nr.	An- fang	Dauer	Atemvolum pro Minute	O <sub>2</sub> -Ab- nahme	CO <sub>2</sub> -Zu- nahme	O <sub>2</sub> -Ver- brauch	CO <sub>2</sub> - Ausgabe	CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Körpertemperatur am Anfang u. Ende des Versuchs	Blut- druck mm Hg	Anmerkungen
					in der Ven- tilationsluft		pro Minute					
					ccm	%	%	ccm				
XIII.	1	10 <sup>h</sup> 40'	1' 0"	2041	1,91	1,95	39,02	39,73	1,018	38,3 —	145	} Harn zuckerfrei.
	2	10 <sup>h</sup> 53'	0' 55"	2041	2,02	1,96	41,30	40,07	0,970	38,3 —	142	
	3	11 <sup>h</sup> 25'	0' 50"	1977	1,80	1,71	35,61	33,91	0,952	38,5 —	255	} Um 11 <sup>h</sup> 23' werden 0,005 g Adrenalin in die Vena jugularis eingespritzt.
	4	11 <sup>h</sup> 27'	0' 50"	1977	1,51	1,53	29,90	30,30	1,015	— —	210	
	5	11 <sup>h</sup> 33'	0' 55"	1976	1,74	1,44	34,35	28,40	0,827	— —	165	
	6	11 <sup>h</sup> 36'	0' 50"	1976	2,00	1,68	39,60	33,14	0,837	— —	158	
	7	11 <sup>h</sup> 40'	0' 50"	1954	2,21	1,84	43,24	35,87	0,830	— —	150	
	8	12 <sup>h</sup> 1'	0' 55"	2040	2,12	1,97	43,18	40,24	0,932	— 38,0	140	



## Die Versuchsergebnisse.

## I. Verhalten des Blutdruckes.

a) Nach intraperitonealer Adrenalininjektion stieg der Blutdruck in den verschiedenen Versuchsreihen verschieden rasch an; so dauerte es in Versuchsreihe I 15 Minuten, bis der Druck von 127 mm Hg auf 200 angewachsen war, während in Versuchsreihe II der Anstieg von 147 auf 240 bereits in 5 Minuten erreicht war. In den meisten Versuchsreihen fiel der Blutdruck von seinem höchsten Stand wohl bald wieder etwas ab, blieb aber dann stundenlang entweder gleich hoch oder ging allmählich wieder in die Höhe.

b) Nach intravenöser Injektion von 1 mg Adrenalin fing der Blutdruck meist schon nach 20 bis 30 Sekunden an zu steigen, erreichte nach 2 bis 3 Minuten seinen Höchststand und sank dann im Verlaufe von einigen Minuten entweder auf seinen früheren Stand oder noch darunter. Es folge hier ein Beispiel für das Verhalten des Blutdruckes aus Versuchsreihe VII.

	Blutdruck in mm Hg
11° 04'	145
11° 05' Adrenalin: 0,001 g	
11° 06'	215
11° 07'	245
11° 08'	215
11° 09'	120
11° 10'	105
11° 11' Adrenalin: 0,001 g	
11° 12'	205
11° 13'	185
11° 14'	140
11° 15' Adrenalin: 0,001 g	
11° 16'	215
11° 19'	130
11° 20'	90

Von dem Höchststand, der für die Dauer eines Respirationsversuches (8 bis 10 Minuten) in der oben beschriebenen Weise unterhalten wurde, war der Blutdruck innerhalb der ersten halben Stunde immer herabgesunken, oft sogar unter den Stand, den er vor der Injektion hatte und blieb so dann auch während der ganzen übrigen Beobachtungsdauer.

Auf anderweitige Veränderungen der Blutdruckkurve soll hier nicht näher eingegangen werden.

Tabelle  
Versuche mit intraperitonealer

Versuchsreihe	Verän-									
	des O <sub>2</sub> Verbrauches (ccm pro 1 Min.)					der CO <sub>2</sub> -Produktion (ccm pro 1 Min.)				
	verglichen mit den Mittelwerten aus									
	innerhalb der					innerhalb der				
1.	2.	3. u. 4.	5. u. 6.	7. bis 9.	1.	2.	3. u. 4.	5. u. 6.	7. bis 9.	
Viertelstunde nach der Injektion					Viertelstunde nach der Injektion					
I.	—	—	—	-4,34	-5,75	—	—	—	-2,64	-2,53
II.	-1,48	—	-2,06	-2,91	—	-2,27	—	-1,71	-4,66	—
III.	-6,34	-4,22	—	—	—	-3,22	-2,75	—	—	—
IV.	-1,43	—	-3,71	-5,02	-4,60	-1,39	—	-0,75	-1,64	-1,88
V.	-4,49	-5,57	-5,40	—	—	-1,13	-1,63	+0	—	—
VI.	—	—	-2,91	—	-3,43	—	—	+2,49	—	+4,45
Im Mittel										

Der Unterschied in dem Verhalten des Blutdruckes nach intraperitonealer und intravenöser Injektion ist kein prinzipieller: die Resorption des Adrenalins erfolgt eben aus dem Peritonealraum wesentlich langsamer, erzeugt daher eine geringere Blutdrucksteigerung, jedoch von weit längerer Dauer als nach intravenöser Injektion; in letzterem Falle erzeugt eine weit geringere, wenn auch öfters wiederholte Dosis ein weit rascheres Ansteigen des Blutdruckes, der aber bald wieder abfällt.

## II. Adrenalin-Glucosurie.

Bei Durchsicht der Rubrik „Anmerkungen“ in sämtlichen Tabellen mutet es einen wohl recht sonderbar an, in keiner Versuchsreihe nach Injektion von Adrenalin ausgesprochene Glucosurie verzeichnet zu finden, während dies doch sonst laut Erfahrung aller Autoren, besonders nach intraperitonealer Einspritzung von Adrenalin, ein nur selten versagender Demonstrationsversuch ist.

Der Grund der fehlenden Glucosurie liegt offenbar in den obwaltenden Versuchsbedingungen: 1. hatten die Tiere 24 bis 36 Stunden vor dem Versuche gehungert, 2. hatten sie ausreichend Curare bekommen.

ad. 1. Die Glucosurie kommt, wie im Ritzmannschen Versuch (S. 25) gezeigt wurde, am Hungertier wesentlich schwerer als am gefütterten zustande.

## XI.

## Injektion von Adrenalin.

des respiratorischen Quotienten					des Blutdruckes (mm Hg)				
den Versuchen vor der Injektion									
innerhalb der					innerhalb der				
1.	2.	3. u. 4.	5. u. 6.	7 bis 9.	1.	2.	3. u. 4.	5. u. 6.	7. bis 9.
Viertelstunde nach der Injektion					Viertelstunde nach der Injektion				
—	—	—	+ 0,025	+ 0,065	—	—	—	+ 47	+ 47
- 0,053	—	+ 0	- 0,080	—	+ 10	—	+ 5	- 40	—
+ 0,067	+ 0,024	—	—	—	—	—	—	—	—
- 0,004	—	+ 0,047	+ 0,054	+ 0,040	+ 15	—	+ 22	+ 30	+ 30
+ 0,039	+ 0,045	+ 0,070	—	—	+ 20	+ 50	+ 50	—	—
—	—	+ 0,041	—	+ 0,134	—	—	+ 61	—	+ 43
+ 0,012	+ 0,034	+ 0,039	± 0	+ 0,080	+ 15	+ 50	+ 35	+ 12	+ 40

ad. 2. Wie viele curaresierte Hunde, schieden auch meine Tiere in einigen Versuchsreihen gar keinen, in anderen aber in der Regel bloß wenig Harn aus. Nun ist es seit Rose<sup>1)</sup> bekannt, daß es bei verringerter Diuresis trotz sehr hoher Blutzuckerwerte nicht zu einer Glucosurie kommt, und dementsprechend konnte auch Pollak<sup>2)</sup> in seinen Adrenalinversuchen bei ausgeprägter Hyperglykämie, jedoch nicht gesteigerter Diuresis, keine Glucosurie konstatieren.

Daß wir aber trotz regelmäßigen Fehlens der Glucosurie allen Grund haben, eine Veränderung im Kohlenhydratstoffwechsel als Folge einer Adrenalininjektion anzunehmen, wird weiter unten gezeigt werden.

### III. Die Veränderung des O<sub>2</sub>-Verbrauches, der CO<sub>2</sub>-Produktion und des respiratorischen Quotienten.

Ich habe in allen Versuchsreihen die Mittelwerte für den O<sub>2</sub>-Verbrauch, für die CO<sub>2</sub>-Produktion, für den respiratorischen Quotienten und für den Blutdruck vor der Adrenalininjektion berechnet und mit den Werten, die nach der Injektion erhalten wurden, verglichen (Tabellen XI und XIII). Die Veränderungen

<sup>1)</sup> Ulrich Rose, Der Blutzuckergehalt des Kaninchens . . . . und sein Verhalten im Diuretindiabetes. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 50, 15, 1903.

<sup>2)</sup> l. c.

des  $O_2$ -Verbrauches und der  $CO_2$ -Produktion sind außerdem in Prozenten der ursprünglichen Werte angegeben (Tabellen XII und XIV).

Tabelle XII.  
Versuche mit intraperitonealer Injektion von Adrenalin.

Versuchsreihe	Veränderung									
	des $O_2$ -Verbrauches					der $CO_2$ -Produktion				
	in Prozenten der Mittelwerte aus den Versuchen vor der Injektion									
	innerhalb der 1.   2.   3. u. 4.   5. u. 6.   7. bis 9. Viertelstunde nach der Injektion					innerhalb der 1.   2.   3. u. 4.   5. u. 6.   7. bis 9. Viertelstunde nach der Injektion				
I.	—	—	—	-11,4	-15,1	—	—	—	-8,6	-8,3
II.	-4,0	—	-6,0	-8,5	—	-9,9	—	-5,9	-16,1	—
III.	-16,0	-10,6	—	—	—	-9,3	-7,9	—	—	—
IV.	-2,7	—	-7,0	-9,5	-8,7	-3,2	—	-1,7	-3,7	-4,3
V.	-6,9	-0,6	-8,4	—	—	-2,3	-3,3	+0	—	—
VI.	—	—	-4,9	—	-5,8	—	—	+5,1	—	+9,2
Im Mittel	-7,4	-9,6	-6,8	-9,8	-9,9	-5,2	-5,6	-0,6	-9,4	-1,1

a) Versuchsreihen mit intraperitonealer Injektion.

Wie aus Tabelle XI und XIII ersichtlich, zeigt sich in den Versuchsreihen I bis VI nach der intraperitonealen Injektion eine ansehnliche Abnahme des  $O_2$ -Verbrauches, die in der Regel innerhalb der ersten Viertelstunde einsetzt, um dann innerhalb der Beobachtungsdauer von ca. 2 Stunden unverändert bestehen zu bleiben.

Die Abnahme des  $O_2$ -Verbrauches beträgt:

7,4%	innerhalb der 1. Viertelstunde
9,6%	„ „ 2. „
6,8%	„ „ 3. u. 4. „
9,8%	„ „ 5. u. 6. „
9,9%	„ „ 7. bis 9. „

Auch die  $CO_2$ -Produktion zeigt durchwegs eine Abnahme in der 1. und 2. Viertelstunde nach der Adrenalin-einspritzung, die aber an und für sich schon geringer ist als die des  $O_2$ -Verbrauches; von der 3. Viertelstunde anfangen, ist gar statt einer Abnahme häufig eine Zunahme der  $CO_2$ -Produktion zu konstatieren; dementsprechend ist

der respiratorische Quotient, der im Durchschnitt aller Versuchsreihen innerhalb der 1. Viertelstunde die geringe Erhöhung von 0,012 zeigt, in der 2. Viertelstunde um 0,034, in der 3. und 4. um 0,039, in der 7. bis 9. gar um 0,080% erhöht.

b) In den Versuchsreihen mit intravenöser Injektion zeigt sich der O<sub>2</sub>-Verbrauch unmittelbar nach, resp. während der wiederholten Injektionen sehr beträchtlich herabgesetzt, und zwar im Mittel der Versuchsreihen VII bis XI um 13,3%; innerhalb der 1. halben Stunde nimmt der O<sub>2</sub>-Verbrauch dann wieder so weit zu, daß die Verringerung im Mittel aller Versuchsreihen bloß 0,7% beträgt.

In den zeitlichen Ablauf dieser Veränderungen erhalten wir einen guten Einblick aus Versuchsreihen XII und XIII, in denen Respirationsversuche von

Tabelle XIII.

Versuche mit intravenöser Injektion von Adrenalin.

Versuchsreihe	Veränderung																
	des O <sub>2</sub> -Verbrauches (ccm pro 1 Min.)			der CO <sub>2</sub> -Produktion (ccm pro 1 Min.)			des respirat. Quotienten			des Blutdruckes (mm Hg)							
	verglichen mit den Mittelwerten aus den Versuchen vor der Injektion																
	innerhalb der 1.   2.   3. halben Stunde nach der letzten Injektion			innerhalb der 1.   2.   3. halben Stunde nach der letzten Injektion			während der wiederholten Injektionen			innerhalb der 1.   2.   3. halben Stunde nach der letzten Injektion							
VII.	5,78	2,17	—	—	—	—	—	—	—	+0,208	+0,044	—	+0,105	+1,35*	+10	—	—
VIII.	4,71	0,96	—	—	—	—	—	—	—	+0,079	-0,017	—	-0,056	90*	-45	—	-30
IX.	1,62	+3,11	—	—	—	—	—	—	—	+0,091	+0,078	—	+0,097	98*	46	—	72
X.	6,34	2,38	—	—	—	—	—	—	—	+0,048	+0,079	+0,036	—	+85*	-65	-50	—
XI.	14,39	+1,64	—	—	—	—	—	—	—	+0,149	+0,145	—	—	+123*	+33	—	—
Im Mittel										+0,115	+0,066	+0,036	+0,049	+106	-23	-50	-34

\*) Maximalwert.

ganz kurzer Dauer in möglichst kurzen Intervallen angestellt wurden (Tabelle XIII).

Tabelle XIV.

Versuche mit intravenöser Injektion von Adrenalin.

Versuchsreihe	Veränderung							
	des O <sub>2</sub> -Verbrauches				der CO <sub>2</sub> -Produktion			
	in Prozenten der Mittelwerte der Versuche vor der Injektion							
	während der wiederholten Injektionen	innerhalb der 1.   2.   3. halben Stunde nach der letzten Injektion			während der wiederholten Injektionen	innerhalb der 1.   2.   3. halben Stunde nach der letzten Injektion		
VII.	-13,8	-5,2	—	-14,0	+ 8,6	± 0	—	-2,6
VIII.	-12,2	-2,8	—	-2,7	- 4,2	- 4,6	—	-7,5
IX.	+ 3,8	+ 7,3	—	-13,1	+15,6	+17,8	—	-2,5
X.	-14,3	-5,4	-9,4	—	- 9,4	+ 3,4	-5,7	—
XI.	-30,2	+ 2,4	—	—	-19,3	+19,2	—	—
Im Mittel	-13,3	-0,7	-9,4	-9,9	-1,7	+ 7,2	-5,7	-4,2

Aus Tabelle XV ist ganz deutlich zu ersehen, daß die Abnahme des O<sub>2</sub>-Verbrauches zunächst auf die 1. Viertelstunde nach der Injektion von Adrenalin beschränkt ist, und von der 2. Viertelstunde angefangen bereits (in diesen beiden Versuchen) durch eine Zunahme des O<sub>2</sub>-Verbrauches ersetzt ist.

Die Verringerung des O<sub>2</sub>-Verbrauches innerhalb der 1. Viertelstunde beträgt im Mittel beider Versuchsreihen (XII und XIII) 13,4%, also genau dasselbe, was für die übrigen fünf Versuchsreihen (VII bis XI) oben nachgewiesen war.

Was die Änderungen im Gaswechsel von der 2. und 3. halben Stunde ab anbelangt, will ich als Ergebnis der wenigen Versuche, die sich so weit erstreckten, eben nur anführen, daß die Verminderung des O<sub>2</sub>-Verbrauches in dieser Periode durchschnittlich 9,4 und 9,9% betrug, also ungefähr so viel, wie in den entsprechenden Perioden der Versuche mit intraperitonealer Injektion.

Die CO<sub>2</sub>-Produktion zeigt ein ähnliches Verhalten wie in den sub a besprochenen Versuchsreihen; in den Versuchen während der Injektionen ist sie bloß um 1,7%, also in weit geringerem Grade als der O<sub>2</sub>-Verbrauch vermindert, innerhalb der 1. halben Stunde sogar um 7,2% gesteigert, so daß es auf diese

Weise in beiden Perioden zu einer Vergrößerung des respiratorischen Quotienten kommt, der aber hier nicht wie in den Versuchsreihen mit intraperitonealer Injektion allmählich anwächst, sondern unmittelbar nach der Injektion den höchsten Wert zeigt und dann allmählich abnimmt.

Aus obigem ist zu ersehen, daß durch das Einführen gewisser Mengen von Adrenalin in den Körper charakteristische und nicht unbedeutende Veränderungen im Stoffwechsel verursacht werden. Es soll nun versucht werden, eine Erklärung für jene Veränderungen zu finden, namentlich zu ermitteln, warum unter dem Einfluß des Adrenalins

- A. der O<sub>2</sub>-Verbrauch kleiner,
- B. der respiratorische Quotient größer wird;
- C. ob die blutdrucksteigernde und die den Zucker mobilisierende Wirkung des Adrenalins zur selben Zeit einsetzen oder nicht.

A. Verringerung des O<sub>2</sub>-Verbrauches.

1. Man könnte zunächst an eine Intoxikation durch das Adrenalin denken, die sich in einem allgemeinen Herabsetzen des Zellstoffwechsels äußerte. Gegen diese Annahme spricht einerseits der Umstand, daß die Einzeldosen pro 1 kg Körpergewicht in den intraperitonealen Versuchen bloß 0,5 bis 1,0 mg, in den intravenösen Versuchen aber 0,1 bis 0,2 mg betragen,

Tabelle XV.

Versuchsreihe	Veränderung														
	des O <sub>2</sub> -Verbrauches							der CO <sub>2</sub> -Produktion							
	1-2	3-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24	25-28	1-2	3-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24
XII.	+ 3,3	—	- 9,2	- 23,5	—	+ 12,9	—	+ 16,6	- 9,8	- 8,0	- 28,7	—	—	—	+ 8,9
XIII.	- 11,3	- 25,5	—	- 14,4	- 1,4	+ 7,5	+ 7,4	—	- 14,8	- 23,9	- 28,6	- 16,7	- 10,0	+ 1,1	—

Minuten nach der Injektion  
in Prozenten der Mittelwerte aus den Versuchen vor der Injektion

während die letale Dosis für Hunde nach Amberg<sup>1)</sup> 5 mg bei intraperitonealer, resp. 1 bis 2 mg bei intravenöser Applikation beträgt. [Allerdings fand Lesage<sup>2)</sup> als kleinste letale Dosis bei intravenöser Injektion 0,1 bis 0,2 mg pro 1 kg Körpergewicht.]

Gegen diese Annahme spricht aber auch der Umstand, daß die bedeutende Verminderung des O<sub>2</sub>-Verbrauches fast unmittelbar nach der Adrenalininjektion eintritt, dann aber konstant bleibt oder gar wieder von normalen Werten gefolgt wird, während doch im Falle einer allgemeinen Intoxikation und Gewebeschädigung ein zunehmender Rückgang des O<sub>2</sub>-Verbrauches zu erwarten wäre.

2. Ein zweiter Grund wäre in der Blutdrucksteigerung zu suchen. Die Koinzidenz der Verringerung des O<sub>2</sub>-Verbrauches mit der Blutdrucksteigerung ist nämlich — besonders in den Versuchsreihen mit intraperitonealer Injektion — so augenscheinlich, daß man an einen Zusammenhang zu denken fast gezwungen ist.

Nun ist von Tigerstedt<sup>3)</sup> in der Tat, und speziell auch in Adrenalinversuchen, nachgewiesen, daß ein abnorm gesteigerter Blutdruck durchaus nicht eo ipso eine Erhöhung der Herzarbeit bedingt; daß im Gegenteil „auf der Höhe der Adrenalinwirkung bei der dabei stattfindenden starken Abnahme des Minutenvolumens die Arbeit ihr Minimum, 40 g/m, hat . . .“. Trotzdem ist es nicht angängig, zur Erklärung der Verringerung des O<sub>2</sub>-Verbrauches die Blutdrucksteigerung in Anspruch zu nehmen, da ja die ganze normale Herzarbeit kaum 5%<sup>4)</sup> des gesamten Energieumsatzes ausmacht, eine noch so beträchtliche Schwämierung der Herzarbeit daher einen beträchtlichen Anteil an der Verringerung des O<sub>2</sub>-Verbrauches nicht haben kann.

Vollends wird obige Annahme bei der Betrachtung der Versuchsreihen mit intravenöser Injektion hinfällig, in denen

---

<sup>1)</sup> Zitiert bei Rudolf Kobert, Lehrbuch der Intoxikationen, 2. Aufl., 2, 507, 1906.

<sup>2)</sup> Ibidem, S. 1238.

<sup>3)</sup> R. Tigerstedt; Der arterielle Blutdruck; Ergebnisse d. Physiol. 6, 325, 1907.

<sup>4)</sup> R. Tigerstedt; Die Wasserökonomie des Körpers. In: Nagels Handb. der Physiol. des Menschen 1, 579, 1909.



der Blutdruck in der dritten halben Stunde nach der Injektion bereits wesentlich, und zwar unter den Stand gesunken ist, den er vor der Injektion hatte, der  $O_2$ -Verbrauch aber immer noch herabgesetzt ist.

3. Eine weitere Ursache kann in der Hemmung der Darmperistaltik durch Adrenalin liegen, die zuerst von Boruttau<sup>1)</sup> gesehen, dann von Langley<sup>2)</sup> speziell für Magen, Dünn- und Dickdarm des Warmblüters nachgewiesen wurde. Auch das könnte aber nur einen geringen Ausfall bedingen, weil es sich um Hungertiere handelt.

4. Am wichtigsten erscheint mir aber die sehr bedeutende Vasoconstriction zu sein, die auch den Hauptgrund für die enorme Steigerung des Blutdruckes abgibt. Sie betrifft namentlich das Splanchnicusgebiet und, wie Langley<sup>2)</sup> betont, insbesondere die Hauptäste der Arteria coeliaca und der Arteriae mesentericae. Bei der Behinderung der Blutversorgung dieser so ausgedehnten Gebiete (Leber, Darm) ist es dann recht plausibel, daß es zu einer Herabsetzung der in den betreffenden Organen ablaufenden Oxydationsprozesse, also auch ihres  $O_2$ -Verbrauches kommt.

Diese den Umsatz herabsetzende Wirkung des Adrenalins scheint auch dann noch anzuhalten, wenn die Gefäßcontraction bereits nachgelassen hat. So könnte die noch immer anhaltende Verminderung des  $O_2$ -Verbrauches in jenen Perioden erklärt werden, in denen der Blutdruck bereits wieder auf seinen ursprünglichen Wert oder noch darunter gesunken ist.

Es ist aber auch durchaus möglich, daß das Adrenalin durch eine unmittelbare Giftwirkung auf die durch den Splanchnicus versorgten Drüsenzellen — z. B. auf die Leberzellen — deren Stoffumsatz, also deren  $O_2$ -Verbrauch und  $CO_2$ -Produktion, herabsetzt.

Schließlich bedingt auch der Umstand, daß, wie es gleich besprochen werden soll, nach Adrenalininjektion eine vermehrte Kohlenhydratverbrennung stattfindet, eine Abnahme des  $O_2$ -Verbrauches, wenn gleichzeitig äquivalente Mengen Eiweiß oder Fett weniger verbrannt werden.

<sup>1)</sup> H. Boruttau, Untersuchungen über die Nebennieren. Arch. f. d. ges. Physiol. 78, 96, 1899.

<sup>2)</sup> l. c.

### B. Ursache der Vergrößerung des respiratorischen Quotienten.

Neben der Verringerung des  $O_2$ -Verbrauches ist es namentlich die Vergrößerung des respiratorischen Quotienten, die ein besonderes Interesse verdient. Obzwar ich eine Bestimmung des Blutzuckers in den angeführten Versuchsreihen nicht vorgenommen habe, ist nach den übereinstimmenden Befunden der S. 24 angeführten Autoren daran nicht zu zweifeln, daß eine Hyperglykämie auch bei meinen Tieren zustande gekommen war, und daß Leber- und Muskelglykogen es waren, die den vermehrten Blutzucker lieferten.

Dies vorausgesetzt, liegt die Erklärung nahe, daß die Erhöhung des respiratorischen Quotienten von einer erhöhten Beteiligung des durch das Adrenalin mobilisierten Zuckers an den Verbrennungen verursacht wird.

### G. Zeitliches Zusammenfallen der blutdrucksteigernden und zuckermobilisierenden Wirkung des Adrenalins.

Bei intravenöser Injektion von Adrenalin in nicht zu großen Dosen läßt sich nach Ritzmann<sup>1)</sup> nachweisen, daß — abgesehen von einer gewissen Latenzzeit von 20 bis 80 Minuten zu Beginn der Versuche — „die Glucosurie genau so lange dauert, als im Blut Adrenalin vorhanden ist. Sie sistiert nach Abstellen des Adrenalinzuflusses, um beim Öffnen desselben von neuem wieder aufzutreten.“ Da bei intravenöser Injektion auch die Blutdruckerhöhung, wie allbekannt, der Einführung des Giftes auf dem Fuße folgt, ist für diese Fälle die Koinzidenz zwischen „Zuckermobilisierung“ und Blutdrucksteigerung ganz augenscheinlich und allemal auch leicht zu beweisen, sofern überhaupt Glucosurie auftritt. Schwerer ist der Zusammenhang bei nicht intravenöser Applikation des Adrenalins, besonders, wenn die Harnabsonderung nicht erhöht wird. So liegt ein Versuch von Ritzmann<sup>1)</sup> vor, in dem auf den zeitlichen Verlauf der Glucosurie sorgfältig geachtet wurde: Um 9 Uhr 40 Minuten wurden dem Tier 0,004 g Adrenalin subcutan injiziert; der alle 10 Minuten untersuchte Harn blieb bis 1 Uhr mittags zucker-

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

frei, und erst von da ab stellte sich eine Glucosurie von 3stündiger Dauer ein. Wenn also das Auftreten der Glucosurie für den Zeitpunkt der Zuckermobilisierung allein maßgebend wäre, müßte man in meinen Versuchen zu ganz anderen Schlüssen kommen als in Versuchen mit prompt sich einstellender Glucosurie.

Wenn nun auch ein direkter Beweis für das gleichzeitige Einsetzen der Blutdrucksteigerung und der Zuckermobilisierung nur aus fortlaufenden Bestimmungen des Blutzuckers einerseits und des Glykogengehaltes in Muskeln und Leber andererseits hätte erbracht werden können, glaube ich jedenfalls, daß aus dem Verhalten des respiratorischen Quotienten doch so manche Schlüsse zu ziehen sind. Zwar sind die Mittelwerte für die Veränderungen des respiratorischen Quotienten in den angeführten Versuchsreihen vielfach aus Zahlen gezogen, die nicht nur recht verschieden groß sind, sondern oft auch entgegengesetzte Vorzeichen haben (also Vergrößerung und Verkleinerung anzeigen); trotzdem ist nicht zu verkennen, daß die Erhöhung des respiratorischen Quotienten und des Blutdruckes gleichzeitig einsetzen: in den Versuchsreihen I bis VI innerhalb der ersten Viertelstunde, in den Versuchsreihen VII bis XI aber bereits während der wiederholten Injektionen. (In den Versuchsreihen XII und XIII war der respiratorische Quotient bereits in den Versuchen vor der Injektion sehr groß und wurde sodann, statt noch größer zu werden, kleiner!)

Auch ist es recht auffallend, daß in den Versuchsreihen I bis VI (intraperiton. Injektion), wo der Blutdruck in der Regel anfänglich nur wenig, später mehr gesteigert ist, auch der respirator. Quotient gegen Ende der Versuchsreihe größer als zu Beginn ist; und umgekehrt: in den Versuchsreihen VII bis XI (intraven. Injektion), in denen der anfänglichen Steigerung des Blutdruckes ein Sinken desselben folgt, auch der respirator. Quotient anfangs die größten Werte hat und im Laufe der Versuche eine deutlich sichtbare Tendenz zum Kleinerwerden zeigt.

Es würde aber aus diesen Versuchen noch ein Weiteres zu folgern sein. Wenn es sich durch ähnliche oder anders eingerichtete Versuche endgültig bewahrheiten sollte, daß die

vasoconstrictorische und zuckermobilisierende Wirkung des Adrenalins genau zur selben Zeit einsetzen, haben wir auch allen Grund, anzunehmen, daß auch im Mechanismus der beiden Wirkungen ein genauer Parallelismus besteht. Namentlich, da es durch Versuche an Tieren, deren Rückenmark hoch durchschnitten wurde, erwiesen ist, daß die Vasoconstriction durch Adrenalin rein peripher zustande kommt, liegt es da recht nahe, anzunehmen, daß die Verzuckerung des Glykogens in der Leber, die gleichzeitig mit der Vasoconstriction einsetzt, ebenfalls durch periphere Wirkung des Adrenalins beschleunigt wird, und zwar entweder durch direkte Giftwirkung des Adrenalins auf die Leberzellen, oder als Folge einer Ernährungsstörung der Leberzellen, hervorgerufen durch die mangelhafte Blutzufuhr durch die verengten Gefäße. Aus einer solchen Ernährungsstörung ließe sich auch die erhöhte Durchlässigkeit der Leberzellen für Glykogen erklären, die Schirokauer und Wilenko<sup>1)</sup> als wahrscheinliche Ursache der Adrenalin-Glucosurie bezeichnen. Natürlich würde dies eher dafür sprechen, daß die Adrenalin-Glucosurie eine rein hepatogene ist und nicht etwa eine sog. neurohepatogene, bei der Reize aus Zentren in der Oblongata auf dem Wege der Splanchnicusfasern zur Leber gelangen sollten, was wieder aus A. Mayers<sup>2)</sup>, von R. H. Kahn<sup>3)</sup> bestätigten Versuchen hervorging, in denen der Zuckerstich nach Entfernung der Nebennieren keine Glucosurie mehr zu erzeugen imstande war. Die Ergebnisse meiner Versuche lassen sich in folgendem zusammenfassen:

1. Adrenalin erzeugt bei Hunden in Dosen von 0,0005 bis 0,001 g pro 1 kg Körpergewicht intraperitoneal, und 0,0001 bis 0,0002 g pro 1 kg Körpergewicht intravenös beigebracht, nachweisbare Veränderungen im respiratorischen Gaswechsel.

<sup>1)</sup> Hans Schirokauer und G. G. Wilenko, Das diastatische Ferment in der Adrenalinglucosurie nebst Bemerkungen über den Glykogenabbau. Zeitschr. f. klin. Med. 70, 257, 1910.

<sup>2)</sup> André Mayer, Sur le mode d'action de la piqûre diabétique. Rôle des capsules surrénales. Compt. rend. Soc. Biol. 1906.

<sup>3)</sup> R. H. Kahn, Zur Frage nach der inneren Sekretion des chromaffinen Gewebes. Arch. f. d. ges. Physiol. 128, 519, 1909.

2. Die Veränderungen bestehen — bei curarisierten Tieren — in einer stärkeren Abnahme des  $O_2$ -Verbrauches, einer geringeren Abnahme der  $CO_2$ -Produktion und einer entsprechenden Vergrößerung des respiratorischen Quotienten. Die Vergrößerung des respiratorischen Quotienten spricht für eine erhöhte Beteiligung der Kohlenhydrate am Stoffwechsel, was mit der von anderer Seite erwiesenen mit „Zuckermobilisierung“ erklärten Hyperglykämie übereinstimmt. Adrenalin führt demnach zu einer erhöhten Kohlenhydratverbrennung.

3. Die blutdrucksteigernde und die zuckermobilisierende Wirkung des Adrenalins setzen nachweislich zur selben Zeit ein.

---

## Über einige Chlorderivate des Cholesterins.

Von

Stephan Minovici und Bella Hausknecht.

(Aus dem Laboratorium für analytische Chemie der Universität Bukarest.)

(Eingegangen am 12. November 1911.)

60 g Cholesterin (Kahlbaum) wurden in 750 ccm Alkohol gelöst und in die beim Erkalten zu einem Krystallbrei erstarrende Masse bei Zimmertemperatur so lange ein kräftiger Chlorstrom eingeleitet, bis sich das Ganze gelöst hat.

Es tritt Erwärmung auf, die man durch zeitweises Eintauchen des Gefäßes in kaltes Wasser mindert. Die entstehende Lösung ist eine gelbe ölige Flüssigkeit, die im Vakuum über Schwefelsäure eingeengt wurde. Nach einigen Tagen scheidet sich hieraus eine weiße schneeige Krystallmasse aus; diese wird abgesaugt und aus Alkohol umkrystallisiert. Hierbei fällt ein in Alkohol unlöslicher Körper (B) aus. Der in Lösung gegangene Körper (A) erstarrt alsbald zu einer breiigen, butterweichen Substanz, die durch das eingeschlossene Öl gelblich gefärbt ist. Beim Absaugen schrumpft dieselbe auf ein kleines Volumen zusammen und hinterläßt einen Filz feiner, seidenglänzender Krystallnadelchen, die nach einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol analysenrein sind.

Schmelzpunkt der krystallwasserhaltigen Substanz 125°,

„ „ krystallwasserfreien „ 130°.

Die Substanz wurde bei Wasserbadtemperatur und hierauf im Toluolbade bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Es ergaben sich hierbei folgende Werte:

Im Toluolbade:

I.	0,5140 g	verloren nach neunmaligem Erhitzen	0,0492 g H <sub>2</sub> O,
II.	0,4706 g	„ „ „ „	0,0443 g H <sub>2</sub> O,
III.	0,6000 g	„ „ „ „	0,0581 g H <sub>2</sub> O.

I.	entspricht demnach	9,57% H <sub>2</sub> O,
II.	„ „	9,41% H <sub>2</sub> O,
III.	„ „	9,68% H <sub>2</sub> O.

Im Wasserbade:

I.	0,3323 g	verloren bis zur Gewichtskonstanz erhitzt	0,0159 g H <sub>2</sub> O,
II.	0,2665 g	„ „ „ „	0,0112 g H <sub>2</sub> O,
III.	0,3393 g	„ „ „ „	0,0147 g H <sub>2</sub> O,
IV.	0,3740 g	„ „ „ „	0,0161 g H <sub>2</sub> O.

I.	entspricht demnach	4,78% H <sub>2</sub> O,
II.	„ „	4,20% H <sub>2</sub> O,
III.	„ „	4,33% H <sub>2</sub> O,
IV.	„ „	4,30% H <sub>2</sub> O.

Die Verbrennung, in mit Bleichromat gefüllten Röhren ausgeführt, ergab folgende Werte:

Für die im Wasserbade entwässerte Substanz:

I.	0,1237 g	0,3227 g CO <sub>2</sub>	0,1214 g H <sub>2</sub> O,
II.	0,1321 g	0,3489 g CO <sub>2</sub>	0,1297 g H <sub>2</sub> O,
III.	0,1367 g	0,3585 g CO <sub>2</sub>	0,1351 g H <sub>2</sub> O,
IV.	0,2539 g	0,1059 AgCl,	
V.	0,3105 g	0,1296 AgCl.	

Berechnet für	C <sub>40</sub> H <sub>74</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C	H	Cl	O
		71,32	10,99	10,54	7,13
Gefunden		C	H	Cl	O
I.		71,14	10,90	—	—
II.		72,03	10,90	—	—
III.		71,52	10,98	—	—
IV.		—	—	10,31	—
V.		—	—	10,32	—
		<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
		71,56	10,92	10,31	7,21

Für die im Toluolbade getrocknete Substanz:

I.	0,1266 g	0,3356 g CO <sub>2</sub>	0,1148 g H <sub>2</sub> O
II.	0,1212 g	0,3167 g CO <sub>2</sub>	0,1106 g H <sub>2</sub> O
III.	0,1538 g	0,4065 g CO <sub>2</sub>	0,1458 g H <sub>2</sub> O
IV.	0,1570 g	0,4184 g CO <sub>2</sub>	0,1091 g H <sub>2</sub> O
V.	0,1472 g	0,3921 g CO <sub>2</sub>	0,1437 g H <sub>2</sub> O
VI.	0,1251 g	0,3299 g CO <sub>2</sub>	0,1204 g H <sub>2</sub> O
VII.	0,1767 g	0,0736 g AgCl	
Berechnet für C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>			
	C	H	Cl
	72,51	10,36	10,21
	6,90		
Gefunden			
	C	H	Cl
I.	72,00	10,07	—
II.	71,26	10,13	—
III.	72,08	10,53	—
IV.	72,67	—	—
V.	72,64	10,84	—
VI.	71,92	10,69	—
VII.	—	—	10,30
	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	71,99	10,45	10,31
			7,25

Alle Versuche, diese Substanz zu dehalogenieren oder durch die gewöhnlichen Reduktions- oder Oxydationsmittel zu reduzieren oder zu oxydieren, verliefen negativ.

Immer wurde neben einem Teil unverändertem Ausgangsmaterial ein anderer Teil der Substanz zerstört oder in chlorhaltige, harzige Produkte verwandelt.

#### A. Zur Dehalogenierung wurden angewandt:

1. Mehrstündiges Kochen mit alkoholischem Kali am Rückflußkühler.
2. Erhitzen mit Chinolin bis zur Siedetemperatur des letzteren.
3. Erhitzen mit Zinkacetat im Einschlußrohr (6 Stunden auf 140°).
4. Erhitzen mit Anilin im Einschlußrohr (6 Stunden auf 180°).

#### B. Zur Reduktion:

1. Erhitzen mit Natrium in alkoholischer Lösung.
2. Erhitzen mit Natrium in amyalkoholischer Lösung.



## C. Zur Oxydation:

1. Ammoniumpersulfat (mehrstündiges Kochen am Rückflußkühler).

2. Kaliumpermanganat in saurer, alkalischer und neutraler Lösung.

3. Rauchende Salpetersäure.

## Körper B.

Der in Alkohol unlösliche Körper (B) wurde in Chloroform gelöst und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Es hinterbleibt ein farbloses, blumenkohlachtiges Krystallaggregat, das zur Entfernung des alkohollöslichen, gelblichen Teiles mit Alkohol ausgekocht wurde. Der Rückstand wird in Äther, in dem er sehr schwer löslich ist, gelöst und mit Alkohol versetzt einige Tage sich selbst überlassen. Es fallen hierbei farblose, lange Prismen aus, die bei 195° schmelzen und krystallwasserfrei sind.

Die Verbrennung in mit Bleichromat beschicktem Rohr ergab:

I. 0,1340 g	0,3556 g CO <sub>2</sub>	0,1317 g H <sub>2</sub> O
II. 0,1232 g	0,3281 g CO <sub>2</sub>	0,1218 g H <sub>2</sub> O
III. 0,1273 g	0,3380 g CO <sub>2</sub>	0,1254 g H <sub>2</sub> O
IV. 0,1314 g	0,3524 g CO <sub>2</sub>	0,1274 g H <sub>2</sub> O
V. 0,3462 g	0,1091 g AgCl	
VI. 0,3027 g	0,0935 g AgCl	

Berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>1,5</sub>Cl  
oder C<sub>56</sub>H<sub>104</sub>O<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

	C	H	Cl	O
Berechnet für C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>1,5</sub> Cl	72,49	11,21	7,65	8,62
Berechnet für C <sub>56</sub> H <sub>104</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	72,49	11,21	7,65	8,62
Gefunden:	C	H	Cl	O
I.	72,37	10,92	—	—
II.	72,63	10,98	—	—
III.	72,41	10,94	—	—
IV.	73,14	10,77	—	—
V.	—	—	7,79	—
VI.	—	—	7,64	—

---

72,64 10,90 7,71 8,75

## Körper C.

60 g Cholesterin wurden mit 120 com konz. Salzsäure verrieben und in die hierbei entstehende Emulsion das gleiche Volumen Perhydrol (Merck) tropfenweise eingetragen.

Unter Aufschäumen und lebhafter Chlorentwicklung ballt sich das ganze zu einer festen Masse zusammen, die mittels eines Glasstabes zerkleinert, abgesaugt und wiederholt mit Wasser ausgewaschen wurde.

Hierauf wird im Exsiccator getrocknet, einigemal aus Alkohol und schließlich aus Ather umkrystallisiert.

Die Substanz fällt zuletzt in feinen Krystallnadelchen aus, die bei 123° schmelzen und krystallwasserhaltig sind.

Der Körper wurde im Wasserbade bis zur Gewichtskonstanz entwässert.

Es ergaben sich hierbei folgende Werte:

I.	0,2574 g verloren	0,0118 g H <sub>2</sub> O
II.	0,3164 g „	0,0146 g H <sub>2</sub> O
I.	entspricht demnach	4,58% H <sub>2</sub> O
II.	„ „	4,61% H <sub>2</sub> O.

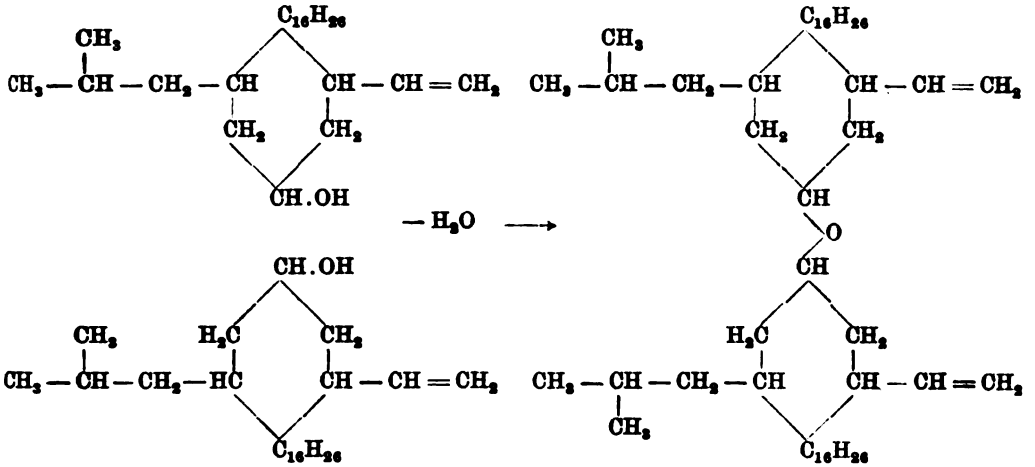
Die wasserfreie Substanz, in mit Bleichromat beschicktem Rohre verbrannt, ergab:

I.	0,1311 g	0,3637 g CO <sub>2</sub>	0,1319 g H <sub>2</sub> O
II.	0,1236 g	0,3402 g CO <sub>2</sub>	0,1327 g H <sub>2</sub> O
III.	0,1273 g	0,3501 g CO <sub>2</sub>	0,1289 g H <sub>2</sub> O
IV.	0,2504 g	0,0880 g AgCl	
V.	0,3272 g	0,1155 g AgCl	

Berechnet für C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> ClO		C	H	Cl	O
		75,82	11,66	8,62	3,88
Gefunden:	C	H	Cl	O	
I.	75,66	11,17	—	—	
II.	75,06	11,92	—	—	
III.	75,00	11,25	—	—	
IV.	—	—	8,69	—	
V.	—	—	8,73	—	
		75,24	11,44	8,71	4,61

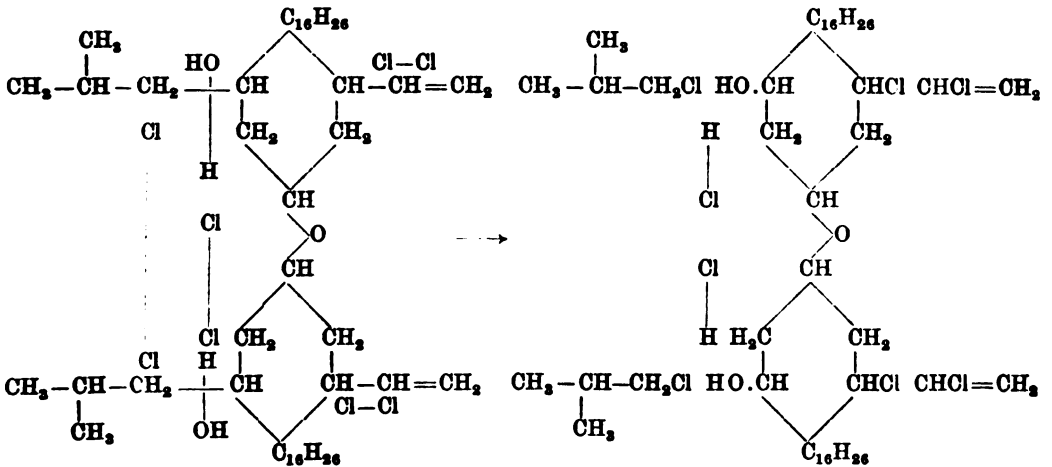
Im Anschlusse an die aus dem experimentellen Teil für das in Alkohol lösliche Produkt (A) sich ergebende empirische Formel: C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>ClO<sub>1,5</sub> bzw. C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>ClO<sub>1,5</sub>, oder deren Verdoppelungen: C<sub>40</sub>H<sub>72</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bzw. C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, glauben wir die Entstehung dieses Körpers folgendermaßen strukturell deuten zu dürfen:

1. Zunächst treten 2 Moleküle Cholesterin unter Wasser-  
austritt zu einem Äther zusammen:



Derartige Äther des Cholesterins sind bekannt und auch von dem einen von uns dargestellt worden<sup>1)</sup>.

2. Sodann wird unter dem halogenierenden und oxydierenden Einflusse des Chlors sowohl die Vinyl- auch die Isobutylgruppe abgespalten und einerseits durch Halogen andererseits durch Hydroxyl ersetzt:



<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1562, 1908.

Die Möglichkeit derartiger Loslösungen von tertiären Alkyl- und Isobutylgruppen wurde von Bodroux (Thèse de doctorat 1898) bewiesen.

Die auf diese Weise entstehende Substanz:  $C_{21}H_{34}ClO_{1.5}$  bzw.  $C_{42}H_{68}Cl_2O_3$  weist der experimentellen Formel:  $C_{21}H_{38}ClO_{1.5}$  bzw.  $C_{42}H_{76}Cl_2O_3$  gegenüber einen Mindergehalt von zwei Wasserstoffatomen auf. Dies ist vielleicht dem Umstande zuzuschreiben, daß unter dem reduzierenden Einflusse des aus dem Alkohol der Lösung, unter Einwirkung des Chlors entstehenden Aldehyds, diese Wasserstoffanzahl von obengenannter Substanz aufgenommen wird.

Selbstverständlich gilt die vorangehende Spekulation vorläufig rein hypothetisch, da die Beständigkeit des Produktes, wie schon im experimentellen Teil bemerkt wurde, uns bis jetzt nur geringes Tatsachenmaterial zur Beweisführung derselben ermöglichte.

---

# Über das Schicksal der stereoisomeren Milchsäuren im Organismus des normalen Kaninchens.

Von  
Jakob Parnas.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 11. November 1911.)

Während durch mehrere Untersuchungen die Beziehungen zwischen sterischer Konfiguration und dem Abbau von Kohlenhydraten und Aminosäuren in einfachen und differenzierten Organismen erforscht sind, ist über diejenigen niederen Oxy-säuren wenig bekannt, die als sehr häufiges Stoffwechselprodukt besonders wichtig erscheinen.

Die Stereochemie der Milchsäure ist bis jetzt nur in ihren Beziehungen zur Entstehung der Milchsäure<sup>1)</sup> und ihrem Abbau<sup>2)</sup> durch Mikroorganismen untersucht worden. Was sich aus der Literatur über den Abbau (oder vielmehr Ausscheidung) bei dem höheren Tier entnehmen läßt, ist im folgenden zusammengestellt.

Die meisten Autoren, die Vorkommen und Ausscheidung von Milchsäure bei Tieren untersuchten — ohne Zufuhr von bestimmtem milchsäurebildenden Material — fanden reine Rechtsmilchsäure sowohl in normalen als auch krankhaften Zuständen der Versuchsobjekte.

Diejenigen Autoren, die die Ausscheidung von Milchsäure nach Zufuhr derselben untersuchten, führten den Tieren immer nur racemische Milchsäure zu.

---

<sup>1)</sup> R. Herzog und Hörth, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60, 131 (daselbst auch Literatur).

<sup>2)</sup> Lewkowitsch, Ber. 16, 2720, 1883; Linossier, Bl. [3] 6, 10, 1891 und vor allem Mc Kenzie und Harden, Soc. 83, 427, 1903.

Hoppe-Seyler und Araki<sup>1)</sup> beschreiben einen Versuch an CO-vergifteten Kaninchen, in dem Tiere nach Zufuhr von inaktivem Lactat im Harn ein Gemisch von  $\frac{3}{4}$  Rechtsmilchsäure und  $\frac{1}{4}$  Gärungsmilchsäure ausschieden. Sie fügen zur Erklärung dieses Phänomens hinzu, daß die inaktive Säure zum Teil der Umwandlung in die Paramilchsäure entgangen sein dürfte.

Dieselbe Beobachtung machte E. Neubauer<sup>2)</sup> in einigen seiner Versuche an phosphorvergifteten Kaninchen, denen inaktive Milchsäure als Na-Salz subcutan gegeben wurde. Daneben stehen auch einzelne Versuche dieses Autors, in denen unter den gleichen Bedingungen ein Gemisch von inaktiver und linksdrehender Säure zur Ausscheidung gelangte.

Unter den Versuchen von E. Neubauer an normalen Kaninchen befindet sich auch einer, in dem nach subcutaner Zufuhr von inaktiver Milchsäure im Harn linksdrehende Säure gefunden wurde. Wieviel davon und wieviel von inaktiver Milchsäure daneben ausgeschieden wurde, ist aus der Arbeit nicht zu entnehmen, denn die Drehungsgröße ist nicht angegeben und die Analysenzahlen geben keine eindeutigen Aufschlüsse. In anderen Versuchen fand dieser Autor im Harn eine inaktive Säure.

Die Tatsache, daß in den angeführten Versuchen neben inaktiver Milchsäure auch Fleischmilchsäure ausgeschieden wird, ist leicht zu erklären; das kohlenoxyd- oder phosphorvergiftete Tier scheidet ohnehin Rechtsmilchsäure aus, dagegen von der zugeführten inaktiven Säure nur 12 bis 25% (Neubauer, l. c.). Daraus erklärt sich das Vorkommen von Gemischen aus Rechtsmilchsäure und Gärungsmilchsäure in Harnen solcher Tiere.

Die Ausscheidung von Linksmilchsäure in den von Neubauer beobachteten normalen und pathologischen Fällen werde ich im Anschluß an meine Versuchsergebnisse besprechen.

Jnouye und Kondo<sup>3)</sup> haben sich mit der Zerstörung von Rechtsmilchsäure, die in der Autolyse von Muskelextrakt entstanden ist, durch weitere Autolyse, beschäftigt. Sie stellen in

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 373.

<sup>2)</sup> Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61, 393 ff.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 497, 1908.

Frage, ob sich l-Säure und inaktive Säure in gleicher Weise verhalten mögen, machen aber keine diesbezüglichen Versuche.

Ich habe das Schicksal subcutan gegebener, vergleichbarer Mengen von Rechtsmilchsäure, Linksmilchsäure und von inaktiver Milchsäure (als Natrium-Lactate gegeben) bei dem normalen Kaninchen untersucht.

Es stellte sich heraus, daß sich alle drei verschieden verhielten: beide optisch-aktiven Säuren wurden im Maßstabe ganz verschiedener Größenordnung ausgeschieden; die Ausscheidung der racemischen Säure lag ihrer Größe nach nicht dazwischen, sondern viel näher der Rechtsmilchsäure. Dabei wurde sie asymmetrisch angegriffen.

Die nachfolgende Tabelle gibt den instruktivsten unter den von mir ausgeführten Versuchen.

Ein gesundes, junges Kaninchen (Gewicht 1600 g) bekam in Intervallen von 2 Tagen je ein Zehntel der drei Milchsäuren (als Natriumsalz).

	Harnmenge	Reaktion	Ausgeschieden		
			l-Säure	d-Säure	inakt. Säure
4,5 g l-Milchsäure . . .	180 ccm	sauer	2,17 g	—	—
4,5 g d-Milchsäure . .	320 ccm	stark alkalisch	—	0,1 g	—
9,0 g inakt. Milchsäure	290 ccm	neutral	0,2 g	—	0,32 g

In 3 Tagen nach der letzten Einspritzung ging das Tier unter Ödemen zugrunde. In beiden vorherigen ließen sich Ödeme durch eine kleine Gabe  $\text{CaCl}_2$  verhindern.

Andere Versuche ergaben, daß große Dosen Rechtsmilchsäure (9 g bei einem Tier von 1720 g) bis auf eine Ausscheidung von 0,11 g im alkalischen Harn verbrannt wurden, ohne dem Tier Schaden zuzufügen. Dieselbe Dosis l-Milchsäure dagegen wirkte relativ toxisch, und es wurden innerhalb von 26 Stunden 3,1 g davon ausgeschieden; der Harn war sauer und in den Geweben der Tiere keine erhebliche Menge der injizierten Substanz mehr nachzuweisen.

Er ergibt sich aus diesen Versuchen folgendes:

Rechtsmilchsäure wird vom Kaninchen in größtem Umfange verbrannt und nur eine Spur davon ausgeschieden.

Linksmilchsäure wird nicht zu Carbonaten verbrannt, aber in irgendwelcher Weise verändert; ob bloß teilweise oxydiert oder zu Synthesen verwertet (retiniert), läßt sich zurzeit nicht angeben. Ein großer Teil wird ausgeschieden. Über die Art der möglichen Veränderungen kann man nur Vermutungen aussprechen. Wenn es sich um partielle Oxydation handeln sollte, so würde eine Oxydation, die primär an der Oxygruppe angreift, den Unterschied zwischen r- und l-Säure aufheben, und eine Differenz im weiteren Abbau wäre auf diese Weise nicht zu erklären; es muß sich also um Vorgänge anderer Art handeln.

Die racemische Säure wird so abgebaut, als ob sie zu einem kleinen Teil in ihre Komponenten zerlegt und das Gemisch der Stereoisomeren asymmetrisch verändert, bzw. ausgeschieden, ein viel größerer Teil aber als unverändertes Racemat angegriffen worden wäre. Es bestehen offenbar auch noch in Lösung Beziehungen zwischen beiden Komponenten, genügend, um die Angreifbarkeit der einen von der Oxydation der anderen abhängig zu machen.

Ein Teil der racemischen Säure wird also sicher asymmetrisch abgebaut: es wurde neben racemischer auch l-Säure isoliert. Dies erklärt und bestätigt die oben angeführten Ergebnisse von E. Neubauer. In den Versuchen dieses Autors an mit Phosphor vergifteten Tieren erschien im Harn Rechtsmilchsäure dann, wenn die Eigenproduktion an dieser Substanz größer war als die entgegengesetzt gerichtete Abbaudifferenz zwischen den Komponenten der zugeführten inaktiven Säure. War aber diese Abbaudifferenz größer als die vom Organismus abgeschiedene Menge der Rechtsmilchsäure, dann erschien im Harn Linksmilchsäure.

### Experimentelles.

#### I. Darstellung der Milchsäuren.

a) Die optisch-aktiven Säuren wurden nach dem Verfahren von J. L. Irvines<sup>1)</sup> durch Isolierung des schwerer löslichen, krystallisierenden l-Morphiumlaktats von dem sirupösen r-Morphiumlactat erhalten. Die Morphiumlactate wurden mit Ammoniak zerlegt, filtriert, abgedampft, aus saurer Lösung er-

---

<sup>1)</sup> Journ. chem. Soc. 89, 2, 935, 1906.



schöpfend mit Äther extrahiert, aus den Ätherextrakten die Zinksalze dargestellt. Die Ausbeuten betragen gegen 90% der Theorie. Die Reinheit wurde durch Bestimmung des Drehungsvermögens der Zinksalze und der Lithiumsalze festgestellt.

l-Zinklactat (wasserfrei):

1. 5,20 g in 100 ccm drehen im 2 dcm-Rohr um + 0,85° (20°):

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 8,1^{\circ}.$$

2. 3,41 g in 100 ccm drehen im 2 dcm-Rohr um + 0,58°:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 8,53^{\circ}.$$

3. l-Lithiumlactat:

7,64 g in 100 cm drehen im 2 dcm-Rohr um + 2,1°:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 13,7^{\circ}.$$

Aus der Messung von Herzog und Hörth<sup>1)</sup> ergibt sich für die Konzentration von 5,75%:

$$[\alpha]_{\text{D}} = 13,6^{\circ}.$$

4. d-Zinklactat (wasserfrei):

4,8 g in 100 ccm bei 20° drehen im 2 dcm-Rohr — 0,81°:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = - 8,44^{\circ}.$$

5. 4,6 g in 100 ccm bei 20° drehen im 2 dcm-Rohr — 0,79°:

$$[\alpha]_{\text{D}} = - 8,50^{\circ}.$$

---

Für die Versuche mit inaktiver Milchsäure diente über Zinklactat gereinigte Milchsäure von Merck.

#### Milchsäurenachweis und Bestimmung.

Die Milchsäure wurde nach dem Eindampfen des Harnes mit einem Überschuß von Schwefelsäure in Freiheit gesetzt und in einem Extraktionsapparate mit Äther extrahiert. Der benutzte Apparat (dessen Urheber ich nicht anzugeben weiß<sup>2)</sup>), besteht aus einem sinusoidartig gewundenen Rohr, in dem der kondensierte Äther durch eine Säule der zu extrahierenden

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 60, 136.

<sup>2)</sup> Wahrscheinlich stammt ein ähnlicher Apparat von F. Pregl; der verwendete wurde von der Firma Wagner & Menz in München ursprünglich für die medizinische Klinik in Straßburg angefertigt und auch von mir von dieser Firma bezogen.

Flüssigkeit läuft, um dann durch eine seitliche Öffnung in das Kochkölbchen abzufließen.

Zum quantitativen Nachweis diene neben der Uffelmannschen Reaktion mit Eisenchlorid vor allem die vorzügliche Reaktion von Fletcher-Hopkins<sup>1)</sup>.

Sie wurde mit der kleinen Modifikation ausgeführt, daß man die erkaltete oxydierte Schwefelsäurelösung mit dem Thio-phenreagens nicht vermischt, sondern einen Tropfen des Reagens so einfließen läßt, daß sich an der Oberfläche der Schwefelsäure ein dünner braunroter Ring bildet. Stellt man nun das Reagensglas in kochendes Wasser für 10 Sekunden, so sinkt in der Mitte der Flüssigkeit eine rosenrote Schliere von reiner und charakteristischer Farbe zu Boden.

Die Reaktion ist in der Form sehr charakteristisch; während in der üblichen Ausführung z. B.  $\alpha$ -Oxybuttersäure eine der Milchsäure sehr ähnliche Farbreaktion gibt, ist bei der hier beschriebenen der Unterschied nicht zu verkennen. Die Reaktion erfolgt noch sehr scharf bei Verwendung von 1 Tropfen von Lösungen, die 0,1% Milchsäure enthalten.

Was die Reaktion von Uffelbaum betrifft (ich meine natürlich nur die Färbung mit Eisenchlorid, ohne Phenol), so möchte ich hier bemerken, daß dieselbe — wenn sie mit dem Ätherextrakt ausgeführt wird — eine sehr charakteristische Reaktion darstellt; Täuschungen können nur durch homologe Milchsäuren entstehen. Die Färbungen, die Eisenchlorid in Lösungen von Benzoesäure, Essigsäure, Bernsteinsäure hervorruft, dürften mit der intensiven, chinongelben Färbung, die in Milchsäurelösungen entsteht, kaum verwechselt werden können! Jedenfalls beweist das Fehlen der Eisenchloridreaktion im Ätherextrakt absolut sicher die Abwesenheit von Milchsäure.

Der nach dem Abdestillieren des Äthers zurückbleibende Sirup wurde mit 50 ccm Wasser aufgenommen und die Lösung 3 Stunden lang auf dem Wasserbade mit wenig Tierkohle digeriert — die Tierkohle wurde allmählich in sehr kleinen Mengen zugefügt. Dann wurde heiß filtriert, die Kohle gewaschen. Durch diese Manipulation wird die Bleibehandlung entbehrlich. Schwefelsäure und Phosphorsäure sind in dem Ätherextrakt nicht vorhanden.

<sup>1)</sup> Journ. of Physiol. 35, 247, 1907.

Zur Bestimmung wurde die Milchsäure in das Zinksalz übergeführt und gewogen<sup>1)</sup>, das Zinksalz diente zur Krystallwasserbestimmung und Analyse.

Belege:

1. 0,52 g Zinksalz (inaktiv) wurden der oben beschriebenen Behandlung unterworfen. Durch Eindampfen der mit Tierkohle behandelten und Zinkcarbonat neutralisierten und filtrierten Flüssigkeit wurden 0,50 g Zinksalz erhalten.

2. Aus 0,8 g Zinksalz wurde in derselben Weise 0,78 g gewonnen.

Die Darstellung des Zinksalzes erfolgt verschieden, je nach dem man inaktives oder optisch-aktives erwartet.

Das racemische Zinksalz läßt man entweder aus der eingengten Lösung krystallisieren, oder aber — besonders dann, wenn das Vorkommen anderer Säuren daneben zu gewärtigen ist — man fällt die konzentrierte Lösung mit absolutem Alkohol und läßt das gefällte Zinksalz nochmals aus Wasser krystallisieren. Die alkoholische Lösung muß natürlich auf etwaiges Vorhandensein optisch-aktiven Zinklactats untersucht werden.

Optisch-aktive Zinklactate isoliere ich folgendermaßen:

Die wässrige Lösung wird zur Sirupkonsistenz eingedampft, mit einer Spur von dem betreffenden Zinklactat geimpft und durch Reiben zur Krystallisation gebracht. Dann wird der Krystallbrei mit der 10fachen Menge eines Gemisches von

---

<sup>1)</sup> In den letzten Jahren wurden mehrere Versuche gemacht, eine Methode zur Bestimmung der Milchsäure mittels Überführung in Acetaldehyd und jodometrischer Titrierung auszuarbeiten. Trotzdem ziehe ich die alte Methode der Zinksalzdarstellung vor, als die einzige, die einige Sicherheit bietet, daß wirklich reine Milchsäure vorliegt und die erlaubt, die Natur der Milchsäure zu bestimmen. Dies wurde bereits von autoritativer Seite her (Buchner und Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1416 und 48, 1784) betont. Die Unsicherheiten der Milchsäurebestimmungen liegen in der Vorbehandlung des Materials und in der Extraktion; hat man sie einmal in Äther und in die wässrige Lösung übergeführt, dann ist die quantitative Jodierung des Zinksalzes nicht schwer. Wenn große Mengen anderer Säuren, besonders von Oxysäuren und Ketonensäuren, vorhanden sind, dann sind die Fehlerquellen der „Aldehydmethoden“ mindestens ebenso groß und jedenfalls trügerischer als die der „Zinksalzmethode“. Freilich erfordert die Isolierung und Darstellung der Zinksalze mehr Mühe und Sorgfalt als die anderen, mehr mechanisch verlaufenden Methoden.

gleichen Teilen Äther mit Alkohol verrieben. Es fällt gallertiges Zinksalz aus, das in einigen Minuten in eine Krystallmasse übergeht. Die Krystalle werden abfiltriert und mit Äther alkohol gewaschen, dann mit Wasser aufgenommen und wieder krystallisieren gelassen. In der alkohol-ätherischen Mutterlauge ist Milchsäure nicht mehr nachzuweisen.

Läßt man wässrige Lösungen der Zinkparalactate aus stark eingedampften wässrigen Lösungen krystallisieren, so erstarrt die Flüssigkeit oft zu einer Gallerte oder zu einem dichten Gewirr sehr langer, äußerst dünner Krystalle; in kurzer Zeit gehen dann diese in die bekannten dünnen Prismen über. Diese Erscheinung bildet den charakteristischen äußeren Unterschied zwischen den Zinksalzen der racemischen und der optisch-aktiven Milchsäure, denn das aktive Zinksalz schießt spontan aus konzentrierten Lösungen (auch in der Hitze) in großen spießförmigen Krystallen an. Läßt man aber inaktives Zinksalz schnell und aktives langsam krystallisieren, so bekommt man zuletzt Formen, die sich dem Aussehen nach nicht mit Sicherheit unterscheiden lassen.

Ist neben der inaktiven Milchsäure auch noch optisch-aktive zu gewärtigen, dann werden die Zinksalze so isoliert: Aus der konzentrierten Lösung wird mit 90%igem Alkohol das inaktive Zinksalz gefällt, mit dem gefällten dieselbe Prozedur wiederholt. Die vereinigten alkoholischen Mutterlaugen werden verdampft und aus dem Rückstand das Zinksalz wie oben isoliert.

Die polarimetrische Bestimmung der optischen Aktivität von Milchsäuren ist schwer ausführbar, wenn man nur kleine Substanzmengen besitzt und kein Mikropolarimeter zur Verfügung hat; mit 0,1 g Zinksalz ist sie noch sicher, wenn es reine optisch-aktive Milchsäure ist, nicht mehr sicher, wenn sie zum Teil racemisch ist. Ich benutze dann zur Feststellung des Sinnes des optischen Drehungsvermögens eine Art Mischprobe, indem ich den Krystallwassergehalt der Substanz ermittle und unter Zusatz einer passenden — je nach dem zuerst gefundenen Krystallwassergehalt — Menge Links-lactat umkrystallisiere und wieder das Krystallwasser bestimme. Ist der Wassergehalt gewachsen, dann lag Rechtsmilchsäure vor, ist er gesunken oder gleichgeblieben, dann war Links-Milchsäure vorhanden.

### Versuche.

1. Kanichen, 1800 g, mit Gerste gefüttert, erhält subcutan Na-Lactat aus 9 g inaktiver Milchsäure. Infolge eines Versehens war die eingespritzte Flüssigkeit alkalisch und das Tier wird mit gallertartigen Ergüssen unter der Haut in 4 Stunden tot vorgefunden. In der Blase 40 ccm Harn; aus demselben isoliert 0,55 g Zinksalz.

2. Kaninchen, 1720 g, mit Gerste gefüttert, bekommt subcutan Na-Lactat aus 9 g Rechtsmilchsäure. Das Tier scheidet in 24 Stunden 340 ccm stark alkalischen Harn aus. Daraus isoliert: 0,17 g Zinksalz.

0,1702 g verlieren bei 105°: 0,0222 g.

Berechnet für  $\text{Zn} \cdot (\text{C}_3\text{O}_3\text{H}_5)_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ : 12,89%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  
gefunden: 13,06%  $\text{H}_2\text{O}$ .

Mischprobe: Die Gesamtmenge wurde mit 0,17 g l-Zinklactat umkristallisiert.

0,2085 g Zinksalz verlieren bei 105°: 0,0371 g, entsprechend 17,8%  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für  $\text{Zn} \cdot (\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 + 3\text{H}_2\text{O}$ : 18,18%  $\text{H}_2\text{O}$ .

Demnach liegt Rechtsmilchsäure vor.

In 3 Tagen nach der Einspritzung entwickelten sich an beiden Glutäen starke Odeme; Exitus nach 2 Tagen. Die Odemflüssigkeit enthielt keine Milchsäure.

3. Kaninchen, 1680 g, bekommt um 3 Uhr nachmittags subcutan Na-Lactat aus 9 g Linksmilchsäure. Das Tier wird am nächsten Morgen in folgendem Zustande vorgefunden: starker Opisthotonus, verringerte Atemfrequenz (30 Atemzüge in der Minute), in gebeugtem Zustand starre Extremitäten. Indem die Nackenkrämpfe immer häufiger werden und die Atmung immer mehr verlangsamt, geht das Tier gegen 5 Uhr zugrunde.

Harn abgeschieden: 80 g; in der Blase gefunden: 120 g. Reaktion: sauer. Daraus isoliert: 4,86 g Zinksalz.

1,2684 g verlieren: 0,1634 g, entsprechend: 12,88%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  
berechnet für  $2\text{H}_2\text{O}$ : 12,89%.

Polarisation: 0,98 g wasserfreies Salz in 20 ccm Lösung im 1 dem-Rohr drehen um +0,41°.

$[\alpha]_D = +8,56^\circ$ .

Die Muskeln und inneren Organe des Tieres wurden sofort zerkleinert und ausgekocht. Aus dem Extrakt konnte nur eine kleine Menge (0,2 g) inaktives Zinksalz dargestellt werden.

0,1836 g verloren bei 105°: 0,0352 g, entsprechend 19,20%,  
berechnet für  $\text{Zn} \cdot (\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2)_2 + 3\text{H}_2\text{O}$ : 19,33%.

4. Kaninchen, 2600 g, bekommt Na-Lactat aus 9 g Rechtsmilchsäure subcutan. Zu der Injektionsflüssigkeit wurden 5 Tropfen 10%ige  $\text{CaCl}_2$ -Lösung hinzugefügt.

In 24 Stunden 330 ccm Harn, stark alkalisch.

In weiteren 24 Stunden 215 ccm Harn, neutral.

In beiden Harnen keine Milchsäure.

5. a) Kaninchen, 1600 g, bekommt Na-Lactat aus 4,5 g l-Milchsäurelösung unter Zusatz von einigen Tropfen  $\text{CaCl}_2$ .

Ausgeschieden in 48 Stunden 180 ccm saurer Harn. Daraus isoliert 3,40 g Zinksalz.

1,5 g (wasserfrei) in 20 ccm drehen im 1 dcm-Rohr um + 0,52°.

$$[\alpha]_D = 8,33^\circ.$$

2,834 g verlieren bei 105°: 0,3686 g, entsprechend 13,01%,  
berechnet für  $\text{Zn} \cdot (\text{C}_3\text{O}_3\text{H}_5)_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ : 12,89%.

Das Tier zeigte am ersten Tage etwas Opisthotonus, war dann ganz normal.

b) Dasselbe Kaninchen bekommt in derselben Weise 2 Tage später 4,5 g Rechtsmilchsäure zugeführt. In 48 Stunden waren 320 g Harn, stark alkalisch, ausgeschieden.

Aus dem Harn konnte eine kleine Menge Zinksalz (0,06 g) isoliert werden, die durch qualitative Reaktionen als Milchsäure erkannt wurde.

Bis dahin waren Ödeme nicht entstanden.

c) Dasselbe Kaninchen bekommt nach weiteren 2 Tagen Na-Lactat aus 9 g inaktiver Milchsäure. Toxische Wirkungen sind nicht zu beobachten. Harn neutral, in 48 Stunden werden 290 ccm ausgeschieden.

Aus dem Harn wurden 0,92 g Zinksalz isoliert, dieses in der oben beschriebenen Weise fraktioniert. Es wurden erhalten

Fraktion a = 0,31 g,

„ b = 0,53 g.

Fraktion a. 0,2182 g verlieren bei 105°: 0,0301 g, entsprechend 13,79%.

Berechnet für  $\text{Zn} \cdot (\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2)_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ : 12,89%,  
+ 3H<sub>2</sub>O: 18,38%.

Die Analysesubstanz mit 0,2 g l-Zinklactat umkrystallisiert:

0,3683 g verlieren 0,0486 g bei 105°.

Berechnet für  $\text{Zn} \cdot (\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2)_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ : 12,89% H<sub>2</sub>O,  
gefunden: 13,20% H<sub>2</sub>O.

Demnach besteht Fraktion a aus l-Milchsäure.

Fraktion b. 0,4221 g verlieren bei 105°: 0,0753 g, entsprechend 17,83% H<sub>2</sub>O.

Berechnet für 2H<sub>2</sub>O: 12,89%,

„ „ 3H<sub>2</sub>O: 18,18%.

UmkrySTALLISIERT: 0,38 g.

0,2100 g verlieren bei 105°: 0,0396 g, entsprechend 18,87%

H<sub>2</sub>O.

Demnach besteht Fraktion b aus inaktiver Milchsäure.

Beide Fraktionen wurden durch qualitative Reaktionen als Milchsäuren festgelegt. Nach dem Versuch 5c bekam das Kaninchen am Bauch Ödeme und ging in 3 Tagen zugrunde.

6. Kaninchen, 2700 g, bekommt Na-Lactat aus 10 g inaktiver Milchsäure mit etwas CaCl<sub>2</sub> subcutan. Harn neutral, in 48 Stunden 380 com.

Der Harn des ersten Tages enthält Milchsäure, der des zweiten keine.

Es wurden isoliert wie in Versuch 5c zwei Fraktionen; eine von alkohollöslichem Zinksalz a (0,21 g) und eine von alkoholunlöslichem Zinksalz b (0,37 g).

a) 0,1275 g verlieren bei 105°: 0,0168 g, entsprechend 13,22%. Die Substanz wird mit 0,12 g l-Zinklactat umkrystallisiert.

0,1812 g verlieren 0,0236 g, entsprechend 13,05%.

Folglich liegt in Fraktion a l-Milchsäure vor.

b) 0,2003 g verlieren bei 105°: 0,0370 g, entsprechend 18,47% H<sub>2</sub>O.

Es liegt also in Fraktion b nicht ganz reine inaktive Milchsäure vor.

**Zusammenfassung.**

1. Die optisch-aktiven Milchsäuren verhalten sich im Organismus des Kaninchens verschieden.

2. Rechtsmilchsäure ist unschädlich und wird fast vollständig verbrannt.

3. Linksmilchsäure ist in großen Dosen toxisch, sie wird nicht verbrannt, dagegen in zehnfach größerem Maße ausgeschieden als die Rechtsmilchsäure.

4. Racemische Milchsäure wird zum Teil asymmetrisch angegriffen, indem ein Überschuß an l-Milchsäure ausgeschieden wird. Es wird aber viel mehr von der linksdrehenden Komponente als Anteil der racemischen Milchsäure verbrannt, als wenn Linksmilchsäure in gleicher Menge für sich gegeben wird.



# Beiträge zur Kreatinin- und Kreatinausscheidung unter pathologischen Verhältnissen.

Von  
Bernhard Vas.

(Aus dem Laboratorium der Poliklinik in Budapest.)

(Eingegangen am 13. November 1911.)

Die Lehre von der Ausscheidung des Kreatins und des Kreatinins hat eigentlich nur in den letzteren Jahren an Bedeutung gewonnen. Unleugbar hat hieran die Folin'sche<sup>1)</sup> Methode einen großen Anteil, die wegen ihrer Genauigkeit und Einfachheit zum Nachweise der genannten Stoffe gegenwärtig fast allgemein im Gebrauche ist.

Bezüglich der Ausscheidung, insbesondere unter pathologischen Zuständen, sind unsere Kenntnisse aber noch vielfach recht lückenhaft, was um so bedauerlicher ist, als nach der Meinung verschiedener Autoren, so u. a. Mellanbys<sup>2)</sup>, die Kreatin- und Kreatininurie berufen scheinen, in Zukunft auch in der internen Diagnostik eine wichtige Rolle zu spielen. Dieser Umstand läßt die folgenden Mitteilungen, die sich auf die Ausscheidung dieser Stoffe unter verschiedenen pathologischen Zuständen beziehen und einen Teil meiner diesbezüglichen ausgedehnten Untersuchungen bilden, berechtigt erscheinen.

Die eine Versuchsreihe befaßt sich auf Grund von Untersuchungen an zwei Leukämikern mit der Frage des Verhältnisses des Kreatinins zu den Produkten des Kernzerfalls, in der zweiten Versuchsreihe wird in einem Falle von Muskelatrophie infolge von Inaktivität der Einfluß des Muskelgewebes auf die Ausscheidung von Kreatinin und Kreatin untersucht.

<sup>1)</sup> Folin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 1904.

<sup>2)</sup> Mellanby, The Lancet 1911, Nr. 4583.

## I.

Es ist bisher noch nicht erwiesen, ob zwischen der Ausscheidung des Kreatinins resp. Kreatins und den Produkten des Kernzerfalls ein Zusammenhang besteht.

Nach Forschbach<sup>1)</sup> ist eine derartige Annahme theoretisch möglich, nachdem die für Kreatin charakteristische Atomgruppe in dem Pyridinkern des Guanins vorgebildet ist. Auf Grund seiner Versuche bezweifelt Jaffé<sup>2)</sup> die Abstammung des Kreatins von den Nucleinstoffen. Und dies wird auch durch Dörner<sup>3)</sup> bestärkt, der nach Thymusfütterung bei Hunden nie eine Steigerung der Kreatininausscheidung nachweisen konnte.

Zum Studium dieser Frage eignen sich sehr gut Fälle von Leukämie, da diese Krankheit mit größeren Veränderungen des Purinstoffwechsels verbunden zu sein pflegt.

Diesbezüglich stehen uns bisher literarische Daten nur sehr spärlich zur Verfügung.

Steyskal und Erben<sup>4)</sup> fanden in einem Falle von lymphatischer Leukämie auffallend geringe Kreatininwerte (0,01 bis 0,029), auch bei myelogener Leukämie waren die ausgeschiedenen Mengen niedrig (0,2 bis 0,4 g).

Forschbach hatte Gelegenheit, sich mit dieser Frage an zwei Leukämikern eingehend zu beschäftigen. In dem Falle von myelogener Leukämie fand er bei fleischfreier Diät 0,533 bis 0,782 g Kreatinin, zwischen der Ausscheidung von Harnsäure und Kreatinin konnte er keinen Parallelismus feststellen. Auch ein Einfluß der Röntgenbehandlung auf die Ausscheidung dieser Stoffe war nicht bemerkbar. In einem zweiten Falle von Leukämie bewegten sich die Kreatininwerte zwischen 0,500 und 0,689 g.

Wenn man das Verhältnis der Kreatininwerte zum Körpergewicht in Betracht zieht, kommt Forschbach zu dem Schlusse, daß die absoluten Werte des Kreatinins in seinen Fällen von Leukämie gegen die Norm etwas vermindert sind, daß die Ausscheidungsgröße des endogenen Kreatinins auch bei großen Schwankungen der endogenen Harnsäurewerte konstant bleibt und in keiner gesetzmäßigen Abhängigkeit zu diesem Stoffe steht.

Die Fälle, auf die sich meine Untersuchungen beziehen, sind die folgenden:

1. Fall. Frau Johann M., 33 jährig, ist seit 3 Monaten krank. In das Spital der Poliklinik wurde sie den 8. Mai 1911 aufgenommen.

Diagnose: Myelogene Leukämie.

Blutbefund: Hämoglobingehalt: 55%.

Rote Blutkörperchen: 3000000.

Weißer Blutkörperchen: 177000.

<sup>1)</sup> Forschbach, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 58, 1908.

<sup>2)</sup> Jaffé, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 1906.

<sup>3)</sup> Dörner, zit. bei Forschbach.

<sup>4)</sup> Steyskal und Erben, Zeitschr. f. klin. Med. 39, 1900.

Normoblasten in geringer Anzahl. Unter den weißen Blutkörperchen vorwiegend Myelocyten.

Der Versuch umfaßte insgesamt 7 Tage; an den zwei ersten und letzten Tagen erhielt die Patientin gemischte, an den dazwischenliegenden Tagen purinfreie Kost.

In dem 24stündigen Harn wurden der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl, die Harnsäure und die Purinbasen nach Krüger Schmid, das Kreatinin nach der Folinischen colorimetrischen Methode bestimmt.

Während des ganzen Versuchs lag die Patientin zu Bett.

Tabelle I.  
Frau Johann M.

Datum	Harn ccm	N-Gehalt g	Harn- säure g	Purin- basen-N g	Krea- tinin g	Diät	Körper- gewicht
11. V.	1300	8,845	0,8195	0,0204	0,7208	750 g Milch 240 g Fleisch 4 Semmeln do. 1 l Milch 2 Eier 5 Semmeln do. do. 750 g Milch 240 g Fleisch 4 Semmeln Gemüse do.	52 kg
12. V.	1200	10,580	0,8312	0,0172	0,7340		
13. V.	800	10,192	0,5558	0,0182	0,6608		
14. V.	550	8,485	0,5965	0,0176	0,6180		
15. V.	600	7,554	0,5986	0,0218	0,6020		
16. V.	550	7,992	0,6098	0,0152	0,6550		
17. V.	580	9,776	0,5672	0,0152	0,6425		

Die Kreatininwerte sind in den ersten Tagen bei gemischter Kost 0,7208 bis 0,7340 g, bei purinfreier Diät 0,602 bis 0,660 g und zeigen in den letzten Tagen während der gemischten Diät eine geringe Steigerung.

Über die Ausscheidung erhält man besseren Aufschluß, wenn man die Werte in Beziehung zu dem Körpergewicht bringt. Dies ist um so notwendiger, als nach Folin die Kreatingröße eine Funktion des Körpergewichts ist. Unter normalen Verhältnissen ist der Kreatininwert, auf 1 kg Körpergewicht bezogen, 7 bis 11 mg N, entsprechend 19 bis 30 mg Kreatinin. Bei Frauen ist der Koeffizient nach Benedikt und Myers<sup>1)</sup> durchschnittlich 13,4 mg pro Kilogramm.

<sup>1)</sup> Benedikt und Myers, zit. bei Neubauer-Huppert, 1910.

Bei unserer Versuchsperson beträgt die Kreatiningröße bei 52 kg Körpergewicht, auf 1 kg gerechnet, im Durchschnitt 12,7 mg; dieser Wert befindet sich demnach unter dem normalen. Er ist bedeutend größer als die Werte in den Fällen von Steyskal und Erben und steht denjenigen von Forschbach sehr nahe.

Das Verhältnis des Kreatinins zu der Harnsäureausscheidung ergibt einen Parallelismus nur bezüglich der maximalen Werte (am zweiten Tage 0,8321 resp. 0,734 g), während die minimalen Werte nicht zusammenfallen; dem niedrigsten Harnsäurewert 0,558 g entspricht 0,6608 g Kreatinin, dem niedrigsten Kreatininwert 0,602 g hingegen 0,5986 g Harnsäure.

Der Vergleich des Kreatinins mit dem Stickstoffwerte ergibt wenn auch keine Gesetzmäßigkeit der Ausscheidung dieser Stoffe, so doch einen gewissen Parallelismus, indem sowohl die maximalen wie minimalen Werte zusammenfallen.

Klercker<sup>1)</sup> fand dieselben Verhältnisse in Fieberfällen, was die Annahme erlauben würde, daß der Eiweißumsatz während des Fiebers anderer Natur wäre als unter normalen Zuständen. Wahrscheinlich entsteht beim Zerfall des endogenen Organeiwisses Kreatinin, beim Zerfall des normalen exogenen Eiweißes hingegen nicht. Der Eiweißstoffwechsel bei der Leukämie dürfte von demselben Gesichtspunkte aus beurteilt und der Parallelismus zwischen der Ausscheidung beider Substanzen auf diese Weise erklärt werden.

Der Einfluß der verschiedenen Diät ist nicht nur auf die Ausscheidung des Gesamtstickstoffs und der Harnsäure, sondern auch auf die des Kreatinins bemerkbar. Dies zeigt sich aus folgendem Vergleiche der Mittelwerte:

	Gemischte Diät g	Purinfreie Diät g
Kreatinin . . . . .	0,6881	0,6269
Stickstoff . . . . .	9,2982	8,7437
Harnsäure . . . . .	0,7069	0,5836

Relativ am geringsten ist der Unterschied bei dem Stickstoff, was wohl mit dem Einflusse des leukämischen Processes auf den Eiweißstoffwechsel im Zusammenhange steht.

<sup>1)</sup> Klercker, Zeitschr. f. klin. Med. 68, 1909.

2. Fall. Frau Georg F., 58 Jahre alt. Wurde in das Spital der Poliklinik am 13. April 1911 aufgenommen. Erkrankte vor 7 Monaten.

Der Befund bei der Aufnahme:

Hämoglobingehalt: 60%.

Rote Blutkörperchen: 3700000.

Weiße Blutkörperchen: 272000.

Diagnose: Gemischtzellige Leukämie.

Während der Röntgenbehandlung war der Blutbefund:

Hämoglobingehalt: 70%.

Rote Blutkörperchen: 4000000.

Weiße Blutkörperchen: 126000.

Der Versuch erstreckte sich in diesem Falle auf 14 Tage, davon entfielen 8 Tage auf die Zeit vor der Behandlung, 6 Tage auf die nach der Behandlung.

Tabelle II.  
Frau Georg F.

Datum	Harn ccm	Gesamt- stickstoff g	Harn- säure g	Purin- basen-N g	Kreatinin g	Chlor g	Phosphor- säure g	Kost	Anmerkung
16. V.	850	9,940	—	—	0,5210	—	—	900 ccm Milch 4 Eier 3 Semmeln dieselbe dieselbe dieselbe	Körpergew. 55 kg.
17. V.	820	8,240	0,7481	0,0226	0,6516	—	—		
18. V.	710	6,950	0,5363	0,0169	0,5041	—	—		
19. V.	560	6,430	0,4819	0,0119	0,4130	4,032	1,800		
20. V.	780	7,556	0,6053	0,0160	0,5440	7,480	1,800		
21. V.	800	7,593	0,6541	0,0188	0,5530	5,736	1,734	600 ccm Milch 4 Eier 3 Semmeln 600 ccm Milch 4 Eier 4 Semmeln dieselbe	
22. V.	710	9,070	0,5446	0,0171	0,5750	5,740	1,319		
23. V.	690	7,090	0,4901	0,0137	0,4823	5,837	1,550		
24. V.	—	—	—	—	—	—	—	dieselbe	I. Röntgen- bestrahlung.
25. V.	750	8,547	0,5687	0,0181	0,5235	4,500	2,010	dieselbe	II. Röntgen- bestrahlung.
26. V.	1010	11,594	0,7607	0,0258	0,7328	7,870	2,240	dieselbe	
27. V.	890	9,818	0,4790	0,0210	0,6550	6,230	1,810	dieselbe	
28. V.	950	11,012	0,7217	0,0225	0,6412	6,810	1,920	dieselbe	
29. V.	900	10,054	0,6449	0,0201	0,6174	6,480	1,74	dieselbe	Verläßt das Spital.

Außer den allgemeinen Eigenschaften des 24stündigen Harns wurden das Kreatinin, der Gesamtstickstoff, Harnsäure und Purinbasen quantitativ bestimmt.

Die Patientin erhielt während des ganzen Versuchs purinfreie Kost, ihr Widerwillen gegen Fleisch und ihr verminderte Appetit ließen sie diese Diät strenge einhalten.

Der Harn enthielt gewöhnlich Eiweiß in Spuren, doch wurden Nierenelemente niemals gefunden.

Die Kreatininwerte variierten zwischen 0,4130 und 0,7328 g. Die Durchschnittsmenge stellt sich auf 0,5703 g bei einem Körpergewicht von 55 kg auf 10,4 mg pro kg Körpergewicht.

Dieser Wert liegt ebenso wie im vorhergehenden Falle unter der Norm, selbst wenn wir die Behandlungsperiode der Bestimmung zugrunde nehmen, indem während dieser Zeit der Durchschnittswert 0,6339 g, auf 1 kg Körpergewicht berechnet, 11,5 mg betrug. Das Verhältnis des Kreatinins zur Harnsäure und Purinbasenausscheidung weist zwar keine Gesetzmäßigkeit auf, doch ist ein gewisser Parallelismus, und zwar bezüglich der Maximalwerte, nicht zu verkennen. So entfallen sowohl vor als auch während der Röntgenbehandlung die höchsten Kreatininwerte (0,7328, 0,6516 g) auf die größte Harnsäure- und Purinbasenausscheidung (0,7607, 0,7481 und 0,0258, 0,0226 g). Bei den Minimalwerten ist diese Übereinstimmung nicht immer vorhanden. Im allgemeinen zeigen jedoch die Harnsäurewerte größere Schwankungen wie die Kreatininwerte.

Das Verhältnis der Kreatininausscheidung zur Stickstoffausscheidung zeigt insbesondere während der Röntgenbehandlung einen Parallelismus. Außer den Röntgenstrahlen dürften hierbei dieselben Momente mitgewirkt haben, die bereits in unserem ersten Falle als Resultat des mit der Krankheit zusammenhängenden, vom Normalen abweichenden Eiweißzerfalles erwähnt wurden.

Über die Wirkung der Bestrahlung auf die Kreatininausscheidung besitzen wir nur sehr spärliche Angaben in der Literatur. Forschbach<sup>1)</sup> sah von derselben gar keine Wirkung weder auf die Harnsäure noch auf das Kreatinin. In unserem Falle waren die Durchschnittswerte des Kreatinins vor der Bestrahlung 0,5305, während resp. nach der Bestrahlung 0,6639. Die durchschnittliche Vermehrung beträgt demnach täglich 0,1334 g. Ein gleiches Verhalten läßt auch die Ausscheidung

---

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

des Stickstoffs, der Harnsäure und Purinbasen, sowie des Chlors und Phosphors erkennen, was aus folgender Zusammenstellung ersichtlich ist.

	Vor der Bestrahlung	Nach der Bestrahlung
Kreatinin . . . . .	0,5305	0,6339
Stickstoff . . . . .	7,8586	10,205
Harnsäure . . . . .	0,5801	0,6350
Purinbasen-N . . . . .	0,0167	0,0215
Chlor . . . . .	5,765	6,378
Phosphorsäure . . . . .	1,640	1,944

Da die Diät während des ganzen Versuchs dieselbe war, so kann angenommen werden, daß infolge der Bestrahlung außer den Purinstoffen auch die Ausscheidung des Kreatinins eine Steigerung erfahren hat. Dieses Resultat bildet gewissermaßen eine Ergänzung meiner früheren, an bestrahlten Leukämikern gefundenen Versuchsergebnisse<sup>1)</sup>.

Die in unseren zwei Fällen von Leukämie ausgeführten Versuche haben demnach keinen beweisenden Befund für einen direkten Zusammenhang des Kreatinins mit den Zerfallsprodukten der Kernsubstanz ergeben, doch erhellt aus den Versuchsergebnissen des einen Falles, daß gleich der Ausscheidung der Harnsäure und Purinbasen auch das Kreatinin bei purinfreier Diät vermindert, bei gemischter Kost hingegen vermehrt war und daß die Bestrahlung in dem zweiten Falle eine Steigerung sowohl der Purinstoffe wie auch des Kreatinins hervorgerufen hatte.

## II.

Unsere Kenntnisse über die Ausscheidungsverhältnisse des Kreatins sind noch ziemlich lückenhafte. Dies dürfte hauptsächlich dem Umstande zuzuschreiben sein, daß wir über ein verlässliches, direktes Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Kreatins eigentlich noch nicht verfügen. Jüngst hat zwar Walpole<sup>2)</sup> ein Verfahren beschrieben, nach welchem aus der

<sup>1)</sup> Vas, Stoffwechselversuche an bestrahlten Leukämikern. Zeitschr. f. klin. Med. 68, 1909.

<sup>2)</sup> Walpole, Journ. of Physiol. 1910, zit. in Zeitschr. f. Physiologie u. Pathol. d. Stoffwechsels.

violettblauen Kreatin-Diacetyl-Verbindung auf volumetrischem Wege eine Bestimmung möglich wäre, doch fehlen über die Methode noch nähere Angaben.

Das bisherige Verfahren besteht bekanntlich in einer Überführung des Kreatins durch Kochen mit Salzsäure in Kreatinin und in der Bestimmung des letzteren nach der Folinschen Methode. Doch gelingt die vollständige Umwandlung nur mit reinen Kreatinlösungen, während im Harn verschiedene, zum Teil noch unbekannte Momente dies zu verhindern imstande sind. Dadurch verlieren die gefundenen Werte natürlich viel von ihrer Genauigkeit.

Dreibholz<sup>1)</sup>, der sich mit dieser Frage viel beschäftigt hat, ist der Meinung, daß jede kreatinhaltige Flüssigkeit, so auch der Harn ein Säureoptimum besitzt, bei der die Umwandlung am besten, d. h. fast quantitativ gelingt. Diese Säuremenge muß an Vorversuchen genau bestimmt werden. Das Folinsche Verfahren kann zur Kreatinbestimmung mit gutem Erfolge angewendet werden, wenn man nur die größeren Unterschiede in Erwägung zieht, den geringeren Werten aber keine Bedeutung zuerkennt.

Dorner, Hoogenhuyze und Verploegh<sup>2)</sup> erwärmten den Harn 3 Stunden lang mit Normalsalzsäure; wenn der Kreatiningehalt 0,1% nicht überschreitet, läßt sich mittels dieses Verfahrens das Kreatin quantitativ oder fast quantitativ in Kreatinin überführen.

Bei unseren Versuchen bedienen wir uns der Benedikt-Myersschen<sup>3)</sup> Methode. Bei derselben wird der Harn mit der gleichen Menge Normalsalzsäure 15 Minuten bei Druck im Autoklaven erhitzt. Die Umwandlung in Kreatin geht nach Schaffer, Levene<sup>4)</sup> u. a. bei diesem Verfahren in sehr zufriedenstellender Weise vor sich. Nur ist es sehr wichtig, daß der Harn die saure Reaktion beibehält und nicht alkalisch wird, da hierdurch eine Umwandlung des Kreatins in Kreatinin leicht möglich ist. Die Konservierung des Harns mittels Thymol-Chloroform gelang uns gewöhnlich in genügendem Maße.

Unter den verschiedenen Faktoren, die die Ausscheidung des Kreatins zu beeinflussen imstande sind, werden am häufigsten Erkrankungen des Muskelgewebes erwähnt.

Doch gehen diesbezüglich die Meinungen noch auseinander, so daß zur richtigen Erkenntnis dieses Zusammenhanges zahl-

---

1) Dreibholz, Inaug.-Diss., Greifswald 1908.

2) Hoogenhuyze und Verploegh, Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 1908.

3) Benedikt-Myers, zit. in Neubauer-Hupperts Lehrbuch.

4) Schaffer, Levene, zit. in Neubauer-Hupperts Lehrbuch.



reichere Beobachtungen nötig sind. Die folgenden Versuche müssen von diesem Standpunkte aus beurteilt werden und sollen einen Beitrag zu dieser Frage liefern.

Sie beziehen sich auf den 16jährigen Fleischergehilfen B. P. bei dem wegen Genu valgum vom Dozenten v. Illyés eine Osteotomie ausgeführt und ein Gipsverband angelegt wurde, infolgedessen die Versuchsperson an den unteren Extremitäten vollkommen unbeweglich geworden war. Diese absolute Ruhe dauerte 26 Tage. Nach dieser Zeit begann sie Gehübungen zu machen, der Verband wurde entfernt. Die Wunde war per primam geheilt.

Tabelle III.

P. B.

Datum	Harn Tagesmenge ccm	Gesamt-N g	Kreatinin + Kreatin g	Präformiertes Kreatinin g	Kreatin g	Diät	Anmerkung
30. VI.	1010	17,675	1,0221	0,8514	0,1707	Gemischte Kost	Körpergew. 48 kg
1. VII.	1400	—	1,1290	1,0494	0,0796	dieselbe	
2.	—	—	—	—	—	dieselbe	
3.	1200	—	0,8568	0,7636	0,0932	dieselbe	
4.	1040	—	0,8422	0,7078	0,1344	Purinfreie Kost	
5.	1580	—	1,2181	0,7110	0,5071	dieselbe	
6.	1400	16,777	0,8466	0,5025	0,1441	dieselbe	
7.	1760	18,923	0,7696	0,6362	0,1334	Gemischte Kost	
8.	1800	17,894	0,7515	0,7209	0,0306	dieselbe	
9.	—	—	—	—	—	dieselbe	
10.	1660	—	1,0020	0,9765	0,0255	dieselbe	
11.	920	15,146	0,6209	0,5814	0,0395	dieselbe	
12.	1780	—	0,7921	0,7502	0,0419	dieselbe	
13.	1140	12,927	0,6015	0,5013	0,1002	Purinfreie Kost	
14.	1200	14,784	0,6606	0,5586	0,1020	dieselbe	
15.	980	13,829	0,5747	0,5512	0,0235	dieselbe	Körpergew. 46,5 kg
16.	1240	17,880	0,8746	0,6975	0,1771	Gemischte Kost	Der Patient verläßt d. Bett
20.	950	14,975	0,8559	0,8360	0,0199	dieselbe	
21.	960	15,429	0,9033	0,9033	—	dieselbe	
23.	810	15,626	0,9045	0,8704	0,0341	dieselbe	
24.	800	15,880	0,8872	0,8520	0,0352	dieselbe	
25.	860	16,037	0,8926	0,8187	0,0739	dieselbe	

In dem 24 stündigen, genau gesammelten Harn wurde vorerst das präformierte Kreatinin, hierauf das nach Kochen im Autoklaven nachweisbare Gesamtkreatinin bestimmt. Die Diffe-

renz wurde als Kreatinwert betrachtet. Die quantitativen Bestimmungen erfolgten wie bei den vorhergehenden Versuchen mittels der Folin'schen colorimetrischen Methode.

Außer Kreatinin und Kreatin wurde auch der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Der Patient erhielt abwechselnd gemischte und purinfreie Kost.

Die gemischte Kost bestand durchschnittlich aus 900 g Milch, 300 g Fleisch, 250 g Brot und aus Gemüse. Diese Nahrung hatte einen beiläufigen Gehalt von 1550 Calorien und bei einem Körpergewicht von 48 kg fielen auf 1 kg Körpergewicht 32 Calorien. Diese Menge entsprach vollkommen den Bedürfnissen der ruhenden Versuchsperson.

Die purinfreie Kost bestand aus 900 g Milch, 250 g Kartoffeln, 6 Eiern und 300 g Brot. Der Caloriengehalt betrug ca. 1750 Cal., per Kilogramm Körpergewicht 37 Cal.

Während des Versuches war eine Körpergewichtsabnahme konstatierbar. Als der Kranke das Bett verließ, war das Körpergewicht 46,5 kg. Was die Versuchsergebnisse betrifft, war die Kreatininausscheidung im allgemeinen niedrig, indem die Werte zwischen 1,0494 und 0,5013 schwankten.

Auffallend war in unserem Falle das Vorhandensein von Kreatin, das — einen Tag ausgenommen — während des ganzen Versuches in quantitativ bestimmbarer Menge gefunden wurde. Die Mengen variierten zwischen 0,0199 und 0,5071 und waren zumeist bei purinfreier Diät etwas höher, wie bei gemischter Kost, im Gegensatz zur Kreatinausscheidung, die bei purinfreier Diät niedrigere Durchschnittswerte aufwies.

Nachdem Folin, Hoogenhuyze und Verploegh bei fleischfreier Diät entweder überhaupt kein Kreatin fanden oder aber dasselbe nur in minimalen Mengen nachweisen konnten, kann die Ausscheidung von Kreatin in unserem Falle als ein abnormer Befund betrachtet werden.

Unter den Ursachen, die zur Kreatinausscheidung führen können, sind mehrere bekannt. So fanden sie Hoogenhuyze und Verploegh bei hohem Fieber, bei Diabetes, bei Typhus abdominalis, bei der Basedowschen Krankheit, beim Lebercarcinom. Alle diese Erkrankungen kommen in unserem Falle nicht in Betracht. Auch das Hungern oder ungenügende Ernährung können zu Kreatinurie führen. Doch kann auch dieser

Umstand aus dem Bereiche der Erwägungen ausgeschlossen werden, nachdem die Calorienmenge sowohl bei der purinfreien wie auch bei der gemischten Kost für vollkommen genügend gelten kann.

Unter gewissen Umständen wurde nach Genuß von Kohlenhydraten Kreatinausscheidung beobachtet. Wenn auch diese Ursache in unserem Falle gleichfalls nicht in Betracht kommt, so sei sie doch der Vollständigkeit wegen hier erwähnt.

Dreibholz konnte in Fällen von Diabetes Kreatinsteigerung nachweisen, wenn zur streng animalischen Kost Kohlehydrate in Form von Brot hinzugefügt wurden. Für die eigentümliche Wirkung der Kohlenhydratzufuhr bei Diabetes ist vorläufig eine Erklärung nicht möglich.

Endlich spielen Veränderungen im Muskelgewebe eine große Rolle in der Ausscheidung von Kreatin, und wir glauben nicht fehlzugehen, wenn wir zur Erklärung unserer Versuchsergebnisse auf diese Quelle zurückgreifen.

Nach Levene und Kristeller<sup>1)</sup> zeigt bei Erkrankungen des Muskelsystems die Kreatinausscheidung zuweilen einen abnormen Verlauf. In Fällen erhöhter Muskeltätigkeit kann sie zwar qualitativ normal sein, indem Kreatin nach Koch<sup>2)</sup> nur bei gemischter Kost auftritt, bei purinfreier Diät hingegen verschwindet. Quantitativ zeigte sich jedoch eine verminderte Zersetzung des exogenen Kreatins und partielle Ausscheidung von Kreatinin.

Bei vermindertener Muskeltätigkeit und Zerfall des Muskelgewebes wurde neben wenig Kreatinin viel endogenes Kreatin gefunden. Auch ein Einfluß durch die Eiweißzufuhr war manchmal bemerkbar, indem bei erhöhter Zufuhr Kreatinin und Kreatin vermehrt ausgeschieden wurden. Hoogenhuyze und Verploegh erwähnen einen Fall von Lähmung der unteren Extremitäten mit Ausscheidung von Kreatin, doch wurden auch Fälle von stärkster Muskelatrophie ohne Kreatinausscheidung beobachtet.

Die anhaltend vermehrte Stickstoffausscheidung und die nach Abnahme des Verbandes objektiv nachweisbare auffallende Abmagerung der unteren Extremitäten führen in unserem Falle notwendigerweise zum Muskelgewebe als Quelle für die Ausscheidung des Kreatins. Diese Annahme hätte naturgemäß eine sichere Grundlage erfahren, wenn wir durch weitere Versuche während der zu erwartenden Regeneration des Muskelgewebes

---

<sup>1)</sup> Levene und Kristeller, zit. bei Ellinger.

<sup>2)</sup> Koch, zit. bei Ellinger.

eine Verminderung in der Kreatinausscheidung hätten konstatieren können. Außere Umstände erlaubten uns aber nur für kurze Zeit, weitere Versuche auszuführen. Nachdem der Patient seine absolute Ruhelage verlassen hatte, wurden während der Gehübungen bis zur Abnahme des Verbandes (am 26. Juli) Kreatinbestimmungen nur in geringer Zahl ausgeführt. Sie berechtigen uns nicht zu weiteren Folgerungen, doch soll es nicht unerwähnt bleiben, daß der einzige Versuchstag, an dem überhaupt kein Kreatin mehr nachgewiesen werden konnte, gerade in diese Zeit fällt.

Eine Erklärung für die erhöhte Ausscheidung des endogenen Kreatins in unserem Falle konnte nicht erbracht werden.

Es ergibt sich demnach aus unseren Versuchen, daß in 2 Fällen von Leukämie ein direkter Zusammenhang zwischen dem Kreatinin und den Purinstoffen nicht konstatiert werden konnte, hingegen zeigte sich ein gewisser Parallelismus zwischen der Ausscheidung des Kreatinins und des Gesamtstickstoffs; auch eine Steigerung der Kreatininwerte infolge der Bestrahlung war unverkennbar.

Das Auftreten von Kreatinurie in dem Falle von Inaktivitätsatrophie kann mit dem Zerfall des Muskelgewebes in Verbindung gebracht werden.

# Elektrometrische Reaktionsbestimmung des Blutes bei Körpertemperatur.

Von

K. A. Hasselbalch und Chr. Lundsgaard.

(Aus dem Laboratorium des Finsen-Instituts, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 17. November 1911.)

Mit 1 Figur im Text.

Der Gehalt der Körperflüssigkeiten an Kohlensäure hat bisher der genauen elektrometrischen Bestimmung ihrer Reaktion Schwierigkeiten bereitet, die daraus entstanden, daß jeder Verlust an Kohlensäure vor oder während der Messung eine bemerkenswerte Reaktionsverschiebung nach der alkalischen Seite hin bewirkt.

Um diesen Fehler zu vermeiden, kann man wie Höber<sup>1)</sup> so vorgehen, daß man die Flüssigkeit und die darin befindliche Wasserstoffelektrode nicht mit reinem Wasserstoff, sondern mit einer Wasserstoff-Kohlensäure-Mischung von der  $\text{CO}_2$ -Spannung der Flüssigkeit sättigt. Dabei wird der Flüssigkeit keine  $\text{CO}_2$  entzogen, und elektromotorisch wirkt, wie Höber (l. c.) gezeigt hat, die Kohlensäure nicht, sie hat eben nur als Verdünnungsmittel des Wasserstoffs eine leicht berechenbare Bedeutung.

Diese an und für sich rationelle Methode (siehe unten S. 80 u. 81) hat u. a. den Übelstand, daß sie eine vorangehende tonometrische Bestimmung der  $\text{CO}_2$ -Spannung der Flüssigkeit fordert, ein Übelstand, der die allgemeine Verwendung der Methode natürlich stark beschränkt.

Von Hasselbalch<sup>2)</sup> ist ein anderer Weg eingeschlagen worden. Nachdem die Flüssigkeit an den Wasserstoff um die Elektrode herum so viel Kohlensäure abgegeben hat, daß das Potential konstant geworden ist (durch Schaukeln des Gefäßes

<sup>1)</sup> Arch. f. d. ges. Physiol. d. Menschen u. Tiere 99, 1903.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. 30, 1910.

wird das nach wenigen Minuten der Fall sein), wird unter Erhaltung der Wasserstoff-Kohlensäure-Atmosphäre über der Flüssigkeit die letztere gewechselt; jetzt wird sich die neue Flüssigkeitsprobe in ungefährem  $\text{CO}_2$ -Gleichgewicht mit der obenstehenden Atmosphäre befinden, so daß jetzt das Diffusionsgleichgewicht ohne  $\text{CO}_2$ -Verlust und so die elektromotorische Konstanz ohne meßbare Reaktionsverschiebung zustande kommen können. Dabei erfordert die ganze Messung nur ca. 30 Minuten Arbeit.

Eine solche Methode wird sich nach unserer Ansicht für die Verfolgung vieler biologischer Probleme als unentbehrlich erweisen. Dabei glauben wir — entgegen Michaelis<sup>1)</sup> —, daß es kaum möglich ist, an die Genauigkeit der Methode zu große Forderungen zu stellen. Die ganz kleinen Reaktionsänderungen einer biologischen Flüssigkeit, die das Resultat einer verhältnismäßig großen Änderung ihrer  $\text{CO}_2$ -Spannung ist, würde sich ohne Zuhilfenahme einer großen Genauigkeit der Methode der Beobachtung leicht entziehen können. Und dabei kann diese kleine Reaktionsänderung von der größten Wichtigkeit für die in der Flüssigkeit sich abspielenden Prozesse gewesen sein. Sörensen<sup>2)</sup> hat für mehrere enzymatische Spaltungen die oft sehr große Bedeutung einer geringfügigen Änderung der Reaktion des Mediums feststellen können. In vielen Fällen handelt es sich hier um Änderungen der H-Ionenkonzentration, die nicht größer sind als die Erniedrigung, die jedermann in seinem Blut durch forcierte Atmung während einer Minute, oder als die Erhöhung, die man durch eine ebenso langdauernde Atmungsunterbrechung leicht hervorrufen kann.

Die elektrometrische Bestimmung solcher kleinen Reaktionsänderungen, die von mäßiger Abgabe oder Anhäufung von Kohlensäure herrühren, mußte aber mit den bisher geübten, praktisch anwendbaren Methoden unsichere Aufschlüsse geben, auch wenn man vor der Messung jeden  $\text{CO}_2$ -Verlust sorgfältig vermied<sup>3)</sup>. Während der Messung wurde nämlich so viel

<sup>1)</sup> Abderhalden, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 5, 520, 1911.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. 21, 1909.

<sup>3)</sup> Einem zu messenden Serum vor der Elektrometrie die unbehinderte  $\text{CO}_2$ -Abgabe an die Luft zu gestatten, würde doch wohl keinem einfallen (Michaelis, l. c., 520).

Kohlensäure aus der Flüssigkeit an die obenstehende Wasserstoff-Atmosphäre abgegeben, daß die H-Ionenkonzentration merklich herunterging; und dieser systematische Fehler wird in den einzelnen Fällen, je nach der  $\text{CO}_2$ -Spannung und dem Säurebindungsvermögen der Flüssigkeit, in verschiedenem Grade die Messungen verfälschen müssen.

Mit der von uns benutzten Methode ist es möglich, die H-Ionenkonzentration irgendeiner  $\text{CO}_2$ -haltigen Flüssigkeit direkt, schnell und richtig zu bestimmen, ohne daß die Kenntnis der  $\text{CO}_2$ -Spannung der Flüssigkeit notwendig ist. In Versuchen, die anderswo<sup>1)</sup> veröffentlicht werden, haben wir so die  $C_{\text{H}}$  des dem lebenden Versuchstier direkt entnommenen arteriellen Blutes unter experimentell variierten Versuchsbedingungen bestimmen können. Bei dieser Gelegenheit aber hat es sich für uns darum gehandelt, die durch Änderungen der  $\text{CO}_2$ -Spannung bewirkten Änderungen der  $C_{\text{H}}$  verschiedener Flüssigkeiten, insbesondere des Blutes, mit der Methode zu untersuchen; aus diesem Grunde sind die Flüssigkeiten mit analysierten Mischungen von Kohlensäure und atmosphärischer Luft gesättigt, und dann ihre  $C_{\text{H}}$  bestimmt worden. Die Versuche sind bei  $38,5^\circ$  angestellt worden. Obschon — in Übereinstimmung mit den theoretischen Erwägungen und praktischen Messungen Hendersons<sup>2)</sup> und Michaelis<sup>3)</sup> — in einer Flüssigkeit von der Zusammensetzung des Blutes die  $C_{\text{H}}$  für das Temperaturintervall 18 bis  $38,5^\circ$  nur wenig ansteigen kann, haben wir es als richtig erachtet, in dieser wie in anderen Beziehungen die direkte Anknüpfung an die natürlichen Verhältnisse bei Warmblütern anzustreben.

---

Mit den hier mitgeteilten Versuchen bezwecken wir:

1. Die durch Kohlensäure bewirkten H-Ionenkonzentrationsänderungen des Blutes messend zu verfolgen. Die Variationen der  $\text{CO}_2$ -Spannungen sind innerhalb der physiologischen Breite gehalten worden.

2. Durch entsprechende Bestimmungen an einer Neutralsalzlösung und zwei Phosphatgemischen haben wir die Bedeutung

<sup>1)</sup> Skand. Arch. f. Physiol. 1912.

<sup>2)</sup> Ergebn. d. Physiol. 8, 300, 1909.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. 18, 1909.

der Anwesenheit von „Puffern“ im Blute auch bezüglich der Kohlensäure nachweisen können.

3. Versuche mit Phosphatmischungen und mit Blut von alkalischer bzw. saurer Reaktion erläutern die Bedeutung der normalen, leicht alkalischen Reaktion des Blutes mit Bezug auf die durch  $\text{CO}_2$  bewirkten Änderungen der H-Ionenkonzentration.

4. Die Reaktion des Blutserums und der Blutkörperchen wird mit der des Gesamtblutes verglichen.

---

Die benutzte Methodik ist in allen Hauptpunkten die in der zitierten Abhandlung Sørensens beschriebene mit der von Hasselbalch (l. c.) für die elektrometrische Reaktionsbestimmung kohlenensäurehaltiger Flüssigkeiten eingeführten Abänderung.

Für das schnelle Arbeiten mit der Methode hat es sich als praktisch erwiesen, das Zufußrohr des Elektrodengefäßes<sup>1)</sup> soviel zu verlängern, daß es direkt unter dem Rande der Platin-Wasserstoffelektrode ausmündet. Dabei wird die Auswechslung der Versuchsflüssigkeit mit einer neuen Portion vollständiger und braucht für die Erreichung des wahren Potentialgleichgewichtes nur einmal vorgenommen zu werden. — Das Elektrodengefäß wird jetzt soviel kleiner konstruiert, daß wir für jede Messung mit  $2 \times 4$  ccm der Flüssigkeit auskommen.

Die Kalomelektrode und das Elektrodengefäß sind mit der Verbindungsflüssigkeit (3,5 n-KCl) in einem Luftthermostaten isoliert angebracht. Das Elektrodengefäß, das die Platin-Wasserstoff-Elektrode in der zu untersuchenden Flüssigkeit enthält, ist in der Weise an einen durch die Wand des Thermostaten geführten Metallarm befestigt, daß man es von außen her heben und so lange schaukeln lassen kann, bis das Diffusionsgleichgewicht eingetreten und die elektromotorische Konstanz konstatiert worden ist. Der zuführende und der abführende Kautschukschlauch des Elektrodengefäßes sind durch Löcher der Thermostatenwand nach außen geführt, so daß man — ebenfalls ohne die Tür zu öffnen — die Versuchsflüssigkeit mit einer neuen Portion auswechseln kann.

Es wurde in den Blutversuchen defibriniertes Ochsenblut verwendet, das immer frisch untersucht wurde. Nach Höber (l. c., S. 588) ist bei gleicher  $\text{CO}_2$ -Spannung die Reaktion ungeronnenen und die defibrinierten Rinderblutes genau dieselbe.

---

<sup>1)</sup> Hasselbalch, l. c., Fig. 2, S. 326.



Die Versuchsflüssigkeit wurde in einer Schüttelflasche auf dem Wasserbad bei  $38,5^\circ$  mit dem betreffenden Kohlensäure-Luft-Gemisch gesättigt. Die Luftmischung von der gewünschten Zusammensetzung wurde in einem Gasometer zubereitet, auf  $38,5^\circ$  erwärmt und zugleich mit Wasserdampf gesättigt, und wurde dann in starkem Strom (ca. 50 l pro Stunde) über 25 cm der Versuchsflüssigkeit in die Schüttelflasche geleitet, bis die vollständige Sättigung als gesichert betrachtet werden konnte (nach 30 Minuten). Dann wurde durch Analyse einer Probe des Luftgemisches die  $\text{CO}_2$ -Spannung der Versuchsflüssigkeit bestimmt und ohne  $\text{CO}_2$ -Verlust eine Probe von ca. 4 cm der Flüssigkeit in das inzwischen mit Wasserstoff durchströmte Elektrodengefäß getan. Nach eingetretenem Gleichgewicht wurden diese 4 cm unter Bewahrung des obenstehenden Wasserstoffs mit einer neuen Probe derselben Flüssigkeit — die sich während dieser vorläufigen Messung fortwährend im Luftstrom auf dem Wasserbad befand — gefüllt und das endgültige Potential ermittelt.

Die elektromotorische Kraft  $\pi_0$  des benutzten Elementes, wenn eine 1 n-H-Ionenlösung zur Messung kommt, mußte bei  $38,5^\circ$  bestimmt werden, um aus dem ermittelten Potential die H-Ionenkonzentration  $C_{\text{H}}$  der Versuchsflüssigkeit, oder nach Sörensens Vorschlag den H-Ionenexponenten,  $p_{\text{H}}$ , berechnen zu können. Die folgenden Werte von  $\pi_0$ , die Koefoed im Carlsberg-Laboratorium festgestellt hat, sind uns in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt worden, wofür wir auch an dieser Stelle den Herren Sörensen und Koefoed unseren besten Dank abstatten möchten.

$\pi_0$ bei 760 mm Hg feuchten Wasserstoffs	
und bei $18^\circ$	0,3377 Volt
20°	0,3375 „
30°	0,3364 „
40°	0,3349 „
50°	0,3326 „
60°	0,3290 „

Durch graphische Interpolation bekommt man bei  $38,5^\circ$  für  $\pi_0$  den Wert 0,3352. Weil wir mit Versuchstemperaturen gearbeitet haben, die gelegentlich mit  $\pm 0,5^\circ$  von  $38,5^\circ$  ab-

wichen, haben wir mit der abgerundeten Zahl  $\pi_0 = 0,335$  gerechnet und so aus dem ermittelten Potential  $\pi$  den  $p_{\text{H}}$  nach dem folgenden Ausdruck berechnet:

$$p_{\text{H}} = \frac{\pi - 0,335}{0,0577 + 0,000198(38,5 - 18)} = \frac{\pi - 0,335}{0,0617}$$

Die Ergebnisse aus dem Versuchsprotokoll (siehe hinten) sind sämtlich auf der umstehenden Kurventafel eingetragen. Die Abszissen geben die Kohlensäurespannungen in Millimeter Hg, die Ordinaten die H-Ionenexponenten an.

Die Ordinate  $p_{\text{H}} = 6,78$  entspricht mit Annäherung der neutralen Reaktion bei  $38,5^{\circ}$  <sup>1)</sup>; die Werte von  $p_{\text{H}}$ , die niedriger sind, entsprechen einer sauren, die höheren einer alkalischen Reaktion.

Die Kurven sind nach den Bestimmungen graphisch ausgeführt. Wie man sieht, weicht in keinem Fall eine Bestimmung von  $p_{\text{H}}$  mit mehr als  $\pm 0,03$  von den von den Kurven angegebenen Werten ab. Das bedeutet für defibriniertes Ochsenblut bei 40 mm CO<sub>2</sub>-Spannung, wo im Durchschnitt  $p_{\text{H}}$  7,36 beträgt, daß wir bei Doppelbestimmungen mit einer maximalen Abweichung von dem Durchschnittswert von ca.  $\mp 7\%$  der H-Ionenkonzentration zu rechnen haben.

I. Die Größe der durch Kohlensäure bewirkten Änderungen der H-Ionenkonzentration defibrinierten Ochsenblutes wird durch Versuche mit 4 Blutproben und je 3, 4, 5 und 4 Einzelbestimmungen festgestellt.

Die Reaktion des Blutes ist in allen vier Fällen eine, wenn auch wenig, so doch meßbar verschiedene; d. h. bei gleicher CO<sub>2</sub>-Spannung ist der  $p_{\text{H}}$  in den vier Fällen ein verschiedener, und zwar:

	$p_{\text{H}}$ bei 40 mm CO <sub>2</sub>
Blut vom 24. II., Versuch 1 . . .	7.31
„ „ 23. III., „ 3 . . .	7.33
„ „ 29. VIII., „ 4 . . .	7.36
„ „ 17. III., „ 2 . . .	<u>7.45</u>
	Durchschnitt 7,36

<sup>1)</sup> Unter der Voraussetzung, daß bei  $38,5^{\circ}$  die Dissoziationskonstante des Wassers  $2,7 \cdot 10^{-14} = 10^{-13,569}$  ist.

Dabei wird es notwendig, den Einfluß der Kohlensäure an den einzelnen Blutproben gesondert zu untersuchen. Unter Be-

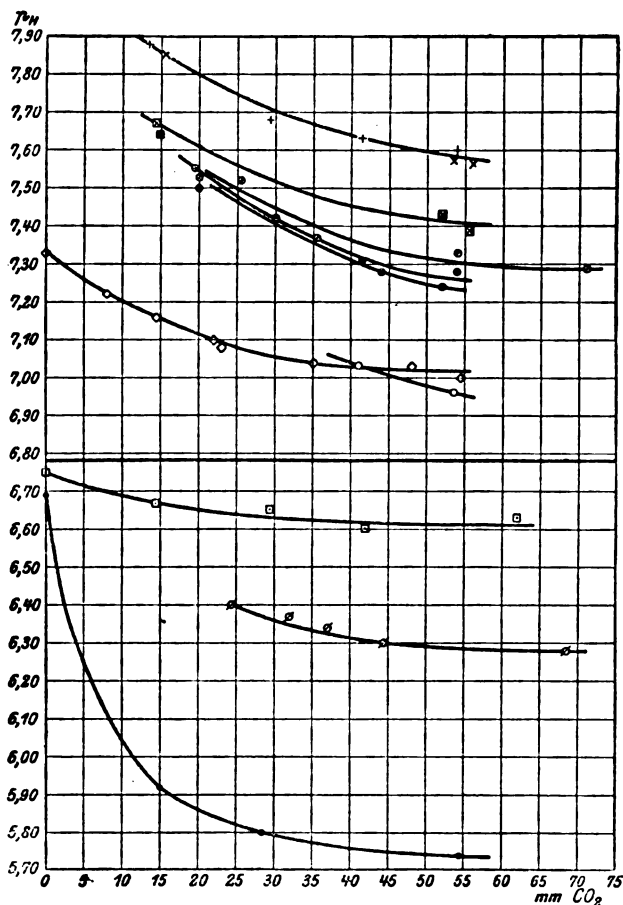


Fig. 1.

- ⊕ Blut, + Serum, ○ Blutkörperchen vom 23. III, Versuch 3. — ⊠ Blut, × Serum vom 17. III, Versuch 2. — ⊗ Blut vom 24. II, Versuch 1. — ⊙ Blut vom 29. VIII. ⊘ Dasselbe mit Essigsäure versetzt, Versuch 4. — ◊ 8,0 sek. Phosphat, Versuch 7. — □ 5,0 sek. Phosphat, Versuch 6. — ●  $\frac{1}{10}$ -Kaliumchlorid, Versuch 5.

nutzung der Kurven ersieht man, daß eine Steigerung der CO<sub>2</sub>-Spannung von 30 mm bis auf 50 mm Hg die folgenden Änderungen der Größe von p<sub>H</sub> bewirkte:

	$p_{\text{H}}$ bei		Differenz
	30 mm CO <sub>2</sub>	50 mm CO <sub>2</sub>	
Blut vom 24. II., Versuch 1 .	7,40	7,25	0,15
„ „ 23. III., „ 3 .	7,42	7,27	0,15
„ „ 29. VIII., „ 4 .	7,45	7,31	0,14
„ „ 17. III., „ 2 .	7,51	7,41	0,10
Durchschnitt .	7,45	7,31	0,14

20 mm Hg ist, jedenfalls für die größeren Warmblüter, ungefähr der Betrag, um den die CO<sub>2</sub>-Spannung des Blutes während eines Kreislaufs anwächst<sup>1)</sup>. Dem Obenstehenden zufolge kann angenommen werden, daß dabei der  $p_{\text{H}}$  des Blutes um 0,14 erniedrigt wird oder daß dabei die H-Ionenkonzentration  $C_{\text{H}}$  von  $0,36 \cdot 10^{-7}$  bis auf  $0,49 \cdot 10^{-7}$  oder um 36% anwächst.

Höber<sup>2)</sup> nahm mit Rinderblut bei Zimmertemperatur mit seiner Methode ganz entsprechende Bestimmungen vor. Für 3 Blutproben bekam er, bei einer Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Spannung von 2,5% bis auf 5,4% einer Atmosphäre (d. h. von 21 bis auf 41 mm Hg bei dem Totaldruck 760 mm) Erhöhungen der  $C_{\text{H}}$  von 118, 31 und 31%<sup>3)</sup>. Für das von Höber untersuchte CO<sub>2</sub>-Spannungsintervall 21 bis 41 mm beträgt in unseren Bestimmungen die prozentische Steigerung der  $C_{\text{H}}$  durchschnittlich 61%.

II. Untersuchungen über die Bedeutung, die man dem Gehalt des Blutes an „Puffern“ mit Bezug auf die respiratorischen Schwankungen der H-Ionenkonzentration zuschreiben muß. Wenn auch das neutralitätsregulierende Vermögen des Blutes anderen Säuren gegenüber von früheren Untersuchern schon mehrfach gezeigt worden ist, bietet doch das Verhalten des Blutes zur Kohlensäure ein so großes Interesse dar, daß uns eine derartige Untersuchung lohnend erschien.

Die vier Bestimmungen, die mit einer Neutralsalzlösung (2/10-KCl) bei variierter CO<sub>2</sub>-Spannung ausgeführt worden sind, demonstrieren die verhältnismäßig schroffen Änderungen der

<sup>1)</sup> Siehe z. B. Bohr, Centralbl. f. Physiol. 21, Nr. 12, Vers. 3 und 4.

<sup>2)</sup> l. c. S. 586.

<sup>3)</sup> Von uns nach graphischer Interpolation berechnet.

$C_H$ , die durch Kohlensäure, besonders durch die allerersten Spuren davon, bewirkt werden. Dagegen ist das Verhalten der Phosphatmischungen ein ganz anderes. Eine ohne  $CO_2$ -Zusatz annähernd neutrale Lösung, die aus gleichen Teilen  $\frac{m}{15}$ - $KH_2PO_4$  und  $\frac{m}{15}$ - $Na_2HPO_4$  besteht (nach Sörensen<sup>1</sup>) wird eine solche Lösung kürzlich „5,0 sek. Phosph.“ genannt), hat durch dieselbe Steigerung der  $CO_2$ -Spannung eine ganz unbedeutende Reaktionsverschiebung nach der sauren Seite hin bekommen. Und eine Lösung, die aus 8 Teilen des sekundären, 2 Teilen des primären Salzes besteht („8,0 sek. Phosph.“) zeigt eine  $p_H$ -Kurve (siehe Tafel), die mit der des Blutes fast parallel verläuft, nur ein wenig flacher.

Die prozentische Änderung der H-Ionenkonzentration, die in den drei Fällen von einer Steigerung der  $CO_2$ -Spannung von 0 bis auf 50 mm bewirkt worden ist, geht aus der folgenden Zusammenstellung hervor:

	$C_H$ bei		Prozentische Steigerung der $C_H$
	0 mm $CO_2$	50 mm $CO_2$	
$\frac{2}{10}$ -KCl . . . .	$2,04 \cdot 10^{-7}$	$18,20 \cdot 10^{-7}$	791
5,0 sek. Phosph.	$1,78 \cdot 10^{-7}$	$2,45 \cdot 10^{-7}$	38
8,0 „ „	$0,47 \cdot 10^{-7}$	$0,98 \cdot 10^{-7}$	108

Das Blut ist mit seinem Gehalt an primären und sekundären Phosphaten sowie besonders an Bicarbonaten und Kohlensäure mit „Puffern“ so wohl versehen, daß die von der unaufhörlichen Produktion und Ausscheidung von Kohlensäure bedingten Schwankungen der H-Ionenkonzentration — wie es die Blutkurven besagen — verhältnismäßig klein ausfallen müssen.

III. Auf der anderen Seite geht aus unseren Bestimmungen hervor, daß die — wenn auch nur geringe — alkalische Reaktion des Blutes respiratorische Schwankungen der H-Ionenkonzentration bedingt, die relativ größer ausfallen müssen, als wenn die Reaktion des Blutes neutral oder sauer wäre.

Betrachten wir die zwei Kurven, die aus den Bestimmungen vom 29. VIII. (Versuch 4) mit Blut ohne und mit Zusatz von Essigsäure hervorgingen.

<sup>1</sup>) l. c. S. 202.

Eine Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Spannung von 30 bis auf 50 mm hat in den zwei Fällen die folgenden Steigerungen der  $C_{\text{H}}$  bewirkt:

	$C_{\text{H}}$ bei		Prozentische Steigerung der $C_{\text{H}}$ .
	30 mm $\text{CO}_2$	50 mm $\text{CO}_2$	
Blut vom 29. VIII.	$0,36 \cdot 10^{-7}$	$0,49 \cdot 10^{-7}$	36
Dasselbe mit Essig- säure versetzt	$0,44 \cdot 10^{-8}$	$0,51 \cdot 10^{-8}$	16

Dasselbe gegenseitige Verhältnis zeigen die zwei Phosphat-lösungen; für eine Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Spannung von 30 bis auf 50 mm wird in der mehr alkalischen 8,0 sek. Phosph.-Lösung die  $C_{\text{H}}$  um 13%, in der neutralen 5,0 sek. Phosph.-Lösung um nur 4,7% erhöht.

Das besagt, anders ausgedrückt, daß, wo die H-Ionenkonzentration einer mit „Puffern“ versehenen Flüssigkeit schon im voraus groß war, dieselbe durch eine gegebene Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Spannung nicht so sehr in die Höhe geht, als wenn von Anfang an die H-Ionenkonzentration niedriger wäre.

Was das Blut anbelangt, muß gefolgert werden, daß darin eine noch bessere Neutralitätsregulation als die faktische möglich wäre, wenn das Blut, statt schwach alkalisch, neutral oder sauer wäre. Die von dem Stoffwechsel bedingten fortlaufenden Schwankungen der  $\text{CO}_2$ -Spannung würden dann nicht so große relative Änderungen der H-Ionenkonzentration bewirken können.

Wenn nun aber diese respiratorischen Schwankungen der H-Ionenkonzentration des Blutes, die, wie wir oben sahen, auf ungefähr 36% des Wertes geschätzt werden können, von fundamentaler Bedeutung für die Ausscheidung der Kohlensäure und damit für die Sauerstoffzufuhr, kurz für die normale Erhaltung der Atmungstätigkeit sind — und das ist bei dem jetzigen Stande unseres Wissens keine gewagte Annahme —, so wird es augenscheinlich nicht im Interesse des lebenden Organismus sein, diese kleinen Schwankungen der H-Ionenkonzentration des Blutes stark zu vermindern, was bei einer neutralen oder schwach sauren Reaktion des Blutes möglich wäre.

Vielleicht kann mit dieser Betrachtung ein Fingerzeig zum Verständnis der leicht alkalischen Reaktion des Blutes gegeben sein.

IV. In den roten Blutkörperchen allein ist ein Stoff vorhanden, der mit der Blutkohlensäure eine dissoziabile Verbindung eingeht, nämlich das Hämoglobin. Es ist daher nicht zu erwarten, daß bei gleicher  $\text{CO}_2$ -Spannung die H-Ionenkonzentration des Serums und die des Gesamtblutes übereinstimmen sollten.

Tatsächlich ergeben unsere Bestimmungen vom 17. III. (Versuch 2) und vom 23. III. (Versuch 3, siehe Kurventafel und Versuchsprotokoll), daß die Reaktion des Serums deutlich alkalischer ist als die des Gesamtblutes. Am 17. III. ist bei 15 mm  $\text{CO}_2$ -Spannung der  $p_{\text{H}}$  des Blutes 7,66, der des Serums 7,86, bei 55 mm  $\text{CO}_2$  der  $p_{\text{H}}$  des Blutes 7,41, der des Serums 7,58. Im Versuch vom 24. III. verfügen wir über ganze Kurven, aus je vier Bestimmungen konstruiert, woraus zu ersehen ist, daß bei 40 mm  $\text{CO}_2$  der  $p_{\text{H}}$  des Blutes 7,33, der des Serums 7,64 beträgt.

Daß die größere H-Ionenkonzentration des Gesamtblutes von der Anwesenheit der Blutkörperchen bedingt ist, wird durch die am 23. III. (Versuch 3) vorgenommenen zwei Messungen an dem vom Gesamtblute abzentrifugierten Blutkörperchenbrei bewiesen: bei 40 mm  $\text{CO}_2$  war der  $p_{\text{H}}$  7,04.

Es kann aus diesen Beobachtungen gefolgert werden, daß der Gehalt des Blutes an roten Blutkörperchen (Hämoglobin?) für dessen Reaktion bestimmend sein muß. Auf diese Weise können die in unseren vier Blutproben gefundenen verschiedenen H-Ionenkonzentrationen entstanden sein. Auch in der Natur muß für die tatsächlich vorhandene H-Ionenkonzentration des Blutes die Menge der Blutkörperchen (*ceteris paribus*) mitbestimmend wirken.

Wenn Höber<sup>1)</sup> die Reaktion des Gesamtblutes ein wenig mehr alkalisch als die des zugehörigen Serums fand, so wird es nicht möglich sein, diesen von dem unsrigen abweichenden Befund dadurch zu erklären, daß H. bei Zimmertemperatur, wir bei 38,5° C arbeiteten. Auch bei 18° haben wir mit unserer Methode die Reaktion des Blutes saurer als die des Serums gefunden, und zwar um fast denselben Betrag wie bei 38,5°.

---

<sup>1)</sup> l. c. S. 592.

## Versuch vom 10. XI. 1911.

Defibriniertes Ochsenblut und dazugehöriges Serum. Temp. 18,6°

	mm CO <sub>2</sub>	p <sub>r</sub>
Blut . . . .	40	7,39
Serum . . . .	40	7,65

Vielleicht ist der abweichende Befund Höbers durch die Eigenart seiner Methode, an Blut angewandt, zu erklären. Wie von Bohr, Krogh und Hasselbalch<sup>1)</sup> nachgewiesen wurde, ist besonders bei niedrigen Sauerstoffdrucken die O<sub>2</sub>-Aufnahme des Blutes in hohem Grade von der CO<sub>2</sub>-Spannung beeinflusst. Ob umgekehrt die CO<sub>2</sub>-Aufnahme des Blutes von dem O<sub>2</sub>-Druck beeinflusst wird, mußte dahingestellt werden; „jedenfalls ist diese Wirkung geringfügig und kann für die Verhältnisse im Organismus keine besondere Bedeutung haben“. Es ist demnach die Möglichkeit vorhanden, daß die totale Austreibung des Sauerstoffs bei der Höberschen Methode die CO<sub>2</sub>-Bindung des Blutes modifiziert<sup>2)</sup>. Das Resultat seiner Messungen würde sich dann auf O<sub>2</sub>-freies Blut bzw. Serum, nicht aber auf O<sub>2</sub>-haltiges Blut und Serum beziehen.

Ein einziger Versuch mit variierten O<sub>2</sub>-Spannungen, den wir mit Blut angestellt haben, wird diese hypothetische Erklärung des Höberschen Befundes gewissermaßen erhärten.

## Versuch vom 22. II. 1911.

Defibriniertes Ochsenblut. Temp. 38,5°.

	mm Spannung		
	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	p <sub>r</sub>
I	{ 11,8	9,4	7,69
	{ 11,6	147,1	7,58
II	{ 39,5	137,6	7,39
	{ 39,1	7,2	7,43

Der Versuch zeigt, daß bei konstanter CO<sub>2</sub>-Spannung das Blut bei niedriger O<sub>2</sub>-Spannung alkalischer reagiert als bei hoher (erstes Versuchspaar). Bei physiologischer CO<sub>2</sub>-Spannung (zweites Versuchspaar) ist der Unterschied zwar klein, verläuft jedoch in dieselben Richtung.

<sup>1)</sup> Zentralbl. f. Physiol. 1904, Nr. 22.

<sup>2)</sup> Eine Durchsicht des betreffenden Versuchsprotokolls hat mir (Hasselbalch) in Wirklichkeit gezeigt, daß bei gleicher CO<sub>2</sub>-Spannung das Blut konstant ein wenig mehr CO<sub>2</sub> aufnimmt, wenn die O<sub>2</sub>-Spannung



Wenn diese Beobachtung richtig ist, muß man daraus folgern dürfen, daß die totale Austreibung des Sauerstoffs die Reaktion des Gesamtblutes in künstlicher Weise zu alkalisch erscheinen läßt.

Auch aus diesem Grunde wird man dann die von uns befolgte Methode, wobei das Blut bei der natürlichen  $O_2$ -Spannung untersucht und während der Messung nur teilweise reduziert wird, der Höberschen Methode vorziehen müssen.

Die H-Ionenkonzentration irgendeiner  $CO_2$ -haltigen Flüssigkeit mit großer Genauigkeit elektrometrisch zu bestimmen, ist mit der von uns angewandten Methodik eine Leichtigkeit. Wenn es sich dahingegen um vergleichende Bestimmungen der  $O_H$  einer Flüssigkeit handelt, wo, wie im zirkulierenden Blute, die H-Ionenkonzentration unaufhörlich mit einem gar nicht so kleinen Betrage hin und her schwankt, wird die Sache komplizierter. Wollten wir ganz einfach aus einer bestimmten Vene eine Blutprobe herausnehmen und ohne  $CO_2$ -Verlust die darin befindliche H-Ionenkonzentration bestimmen, so würde uns das keine vergleichbaren Werte liefern. Eine übermäßige Atmungstätigkeit während der Blutprobenahme könnte die Spannung der Blutkohlenensäure herabgedrückt, eine vorangegangene lokale Stauung des Blutes die  $CO_2$ -Spannung erhöht haben.

An einer Stelle des Blutkreislaufes können wir aber die Spannung der Blutkohlenensäure bestimmen, nämlich in den großen Arterien, wo sie mit der mittleren  $CO_2$ -Spannung der Lungenluft niedrig, als wenn sie hoch ist. Die betreffenden Bestimmungen seien hier angeführt:

	mm Spannung		Vol.-% $CO_2$	Bemerk.
	$CO_2$	$O_2$		
Hundeblut I	2,3	7,2	15,35	obs.
	2,3	55,0	11,5	interpol.
	8,2	6,7	26,62	obs.
	8,2	55,0	22,5	interpol.
	48,8	6,8	46,80	obs.
	48,8	55,0	41,0	interpol.
Hundeblut II	8,1	26,7	21,17	obs.
	8,1	12,2	25,0	interpol.
	17,0	31,7	28,47	obs.
	17,0	12,2	33,0	interpol.
Hundeblut III	75,2	152,9	51,53	obs.
	75,2	30,0	55,5	interpol.

sehr genau zusammenfällt (Krogh)<sup>1)</sup>. Für Menschen ad modum Haldane<sup>2)</sup> und für Tiere auf anderen Weisen kann die mittlere alveolare CO<sub>2</sub>-Spannung bestimmt werden.

Wenn wir demnach bei der mittleren CO<sub>2</sub>-Spannung der Lungenluft die H-Ionenkonzentration des Blutes verschiedener Individuen und Tiergattungen bestimmen, so werden wir die gefundenen Größen unter sich vergleichen können, weil es sich dann in allen Fällen um die H-Ionenkonzentration des arteriellen Blutes handelt.

Die zu messende Blutprobe muß also zuerst mit einer CO<sub>2</sub>-Luftmischung von der CO<sub>2</sub>-Spannung der Lungenluft behandelt werden. Unter pathologischen Verhältnissen muß bei Menschen diese CO<sub>2</sub>-Spannung gesondert bestimmt werden; für den normalen Menschen unter gewöhnlichen, physiologischen Bedingungen wird man keine merkbaren Fehler begehen, wenn man die mittlere CO<sub>2</sub>-Spannung der Lungenluft auf 40 mm Hg veranschlägt.

#### Zusammenfassung.

1. Die H-Ionenkonzentration des defibrinierten Ochsenblutes wird bei 38,5° und 40 mm CO<sub>2</sub>-Spannung im Durchschnitt gleich  $10^{-7,36} = 0,44 \cdot 10^{-7}$  gefunden. Der Einfluß der respiratorischen Schwankungen der CO<sub>2</sub>-Spannungen auf die H-Ionenkonzentration des Blutes ist von meßbarer Größe.

2. Durch Untersuchungen an einer Neutralsalzlösung und zwei Phosphatmischungen wird die Bedeutung der Anwesenheit im Blute von „Puffern“ für die Erhaltung einer annähernd konstanten H-Ionenkonzentration illustriert.

3. Die Bedeutung der leicht alkalischen Reaktion des Blutes für die Größe der respiratorischen Schwankungen der H-Ionenkonzentration wird durch einen Versuch mit angesäuertem Blute erläutert.

4. Die H-Ionenkonzentration des Gesamtblutes ist bei gleicher CO<sub>2</sub>-Spannung größer als die des Serums und kleiner als die der Blutkörperchen.

5. Es wird ein Vorschlag gemacht zur Erlangung vergleichbarer Messungen der H-Ionenkonzentration des Blutes verschiedener Individuen.

<sup>1)</sup> Skandin. Arch. f. Physiol. 23, 183, 1910.

<sup>2)</sup> Joura. of Physiol. 32, 1905.

Versuchsprotokoll.

Versuch 1. 24. II. 1911.  
Defibriniertes Ochsenblut.

mm CO <sub>2</sub>	p <sub>H</sub>
19,8	7,50
44,1	7,28
52,1	7,24

Versuch 2. 17. III. 1911.  
Defibriniertes Ochsenblut  
und  
dazu gehörendes Serum.

	mm CO <sub>2</sub>	p <sub>H</sub>
Blut:	14,6	7,67
	14,8	7,64
	51,8	7,43
	55,4	7,39
Serum:	15,6	7,85
	53,6	7,57
	56,0	7,56

Versuch 3. 23. III. 1911.  
Defibriniertes Ochsenblut,  
Serum u. Blutkörperchen.

	mm CO <sub>2</sub>	p <sub>H</sub>
Blut:	19,7	7,55
	30,0	7,42
	41,7	7,31
	54,0	7,28
Serum:	13,4	7,88
	29,5	7,68
	41,7	7,63
	54,0	7,60
Blut- körperchen:	41,0	7,03
	53,5	6,96

Versuch 4. 29. VIII. 1911.  
Defibriniertes Ochsenblut  
und dasselbe mit 4 ccm n-  
Essigsäure pro 100 ccm ver-  
setzt.

	mm CO <sub>2</sub>	p <sub>H</sub>
Blut:	20,0	7,53
	25,4	7,52
	35,3	7,37
	54,2	7,33
	70,9	7,29
Dasselbe angesäuert:	24,3	6,40
	32,0	6,37
	37,0	6,34
	44,7	6,30
	68,7	6,28

Versuch 5. 22. III. 1911.  
<sup>n</sup>/<sub>10</sub>-Calciumchlorid.

	mm CO <sub>2</sub>	p <sub>H</sub>
	0,0	6,69
	15,1	5,92
	28,7	5,80
	54,5	5,74

Versuch 6. 27. III. 1911.  
„5,0 sek. Phosphat“-  
mischung.

	mm CO <sub>2</sub>	p <sub>H</sub>
	0,0	6,75
	14,6	6,67
	29,4	6,65
	41,9	6,60
	61,8	6,63

Versuch 7. 20. III. 1911.  
„8,0 sek. Phosphat“-mischung.

	mm CO <sub>2</sub>	p <sub>H</sub>
	0,0	7,33
	8,0	7,22
	14,5	7,16
	22,2	7,10
	23,2	7,08
	35,4	7,04
	47,8	7,03
	54,5	7,00

## Zur Chemie der Zellgranula.

### Die Zusammensetzung der eosinophilen Granula des Pferdeknochenmarks.

Von

Eugen Petry.

(Aus der medizinischen Klinik in Graz.)

(Eingegangen am 19. November 1911.)

Mit 1 Tafel.

Die histologische Erforschung der als Granula bekannten Differenzierungen des Leukocytenplasmas ließ eine Reihe von biologisch wesentlichen Fragen unbeantwortet. So sind wir zum Beispiel über die chemische Zusammensetzung derselben, über ihre Entstehungsart, ihr weiteres Schicksal und ihre Funktion nur ungenügend unterrichtet. Diese Lücke wird um so fühlbarer, als die Beantwortung dieser Fragen ganz außerordentlich wichtige Probleme der Hämatologie, ganz besonders bezüglich der Spezifität der Leukocytenarten, sicherstellen würde.

Von allen den die Granula betreffenden Fragen ist nun jedenfalls die nach der chemischen Zusammensetzung die wichtigste; denn es kann keinem Zweifel unterliegen, daß eine restlose Lösung derselben uns bedeutsame neue Tatsachen auch für die Beurteilung der Entstehungsweise und Funktion dieser Gebilde beibringen würde. Von diesem Gesichtspunkt aus habe ich es im Jahre 1908 unternommen<sup>1)</sup>, durch planmäßige Isolierungsversuche eine Reindarstellung der eosinophilen Granula des Pferdeblutes anzustreben. Es gelang mit Hilfe

---

<sup>1)</sup> Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 39.

der Einwirkung neutraler Trypsinlösung, die anderen Bestandteile der Leukocyten zur Auflösung zu bringen, und die gegen Trypsin weitgehend resistenten Granula auf diese Weise zu isolieren<sup>1)</sup>. Sie konnten nunmehr auf ihr physikalisches Verhalten geprüft werden, und es war möglich, mikrochemische Reaktionen anzustellen, deren wesentlichstes Ergebnis der stark positive Ausfall der Millonprobe war.

Weitergehende chemische Untersuchungen waren aber nur dann möglich, wenn es gelang, für analytische Zwecke ausreichende Substanzmengen zu gewinnen. Hierfür erschien aber das Blut wegen des geringen Gehaltes an Leukocyten zu unergiebig. Weit größere Ausbeute ließ sich vom Knochenmark erwarten. Ich habe daher seither meine Untersuchungen an diesem Organ weiter fortgesetzt und will im nachfolgenden über die Resultate derselben berichten.

## I.

### Herstellung der Präparate.

Dazu mußten nun vor allem meine an den Blutleukocyten gewonnenen Befunde auf das Knochenmark übertragen werden; denn es war nicht ohne weiteres anzunehmen, daß die eosinophilen Granula beider Zellarten, die doch bezüglich ihrer Lokalisation, ihrer histologischen Beschaffenheit (Kern), sowie ihrer Funktionen nicht als gleichartig anzusehen waren, auch in ihrem chemischen Verhalten übereinstimmen würden.

Vorversuche, bei denen frisches rotes Pferdemark mit neutralen und alkalischen Pankreatinlösungen in der Wärme unter Toluolzusatz behandelt wurde, zeigten jedoch, daß diese Annahme tatsächlich zu Rechte besteht. Es fanden sich auch nach längerdauernder Digestion im Bodensatz der Verdauungsflüssigkeit reichlich unveränderte eosinophile Granula. Bezüglich der recht charakteristischen Resistenz gegen Trypsin besteht somit kein Unterschied zwischen den beiden bereits von Ehrlich auf Grund des gleichen tinktoriellen Verhaltens für identisch gehaltenen Granulaarten.

---

<sup>1)</sup> Die Resistenz der Granula gegen Fermentlösungen war bereits von Weiß erkannt worden, von dessen Publikation ich keine Kenntnis besaß. (Centralbl. f. med. Wiss. 29, 1891.)

Der Bodensatz enthielt jedoch die Granula keineswegs rein, sondern mit verschiedensten anderen Rückständen der Trypsinverdauung verunreinigt. Vor allem waren reichlich Tyrosin und krystallisiertes Hämatin<sup>1)</sup> nachweisbar, daneben Bindegewebsfasern und Knochensplitter. Letztere beiden Verunreinigungen konnten leicht durch wiederholtes Kolieren der in Verdauung befindlichen Massen vermieden werden. Größere Schwierigkeiten bereitete die Beseitigung der beiden krystallinischen Abscheidungen. Die Menge des Tyrosins ließ sich durch Abkürzen der Verdauungszeit und wiederholte kurzdauernde Digestion mit neuen Mengen Trypsinlösung bis auf Spuren herabdrücken. Ganz tyrosinfreie Präparate, die zudem auch kein Hämatin mehr enthielten, gewann ich erst durch vorherige Entfernung des Hämoglobins aus dem zu behandelnden Knochenmark durch Lackfarbigmachung und wiederholte Extraktion mit Hilfe von Ätherwasser.

Die befolgte Darstellungsmethode gestaltete sich also folgendermaßen:

Das Mark wurde durch Absuchen der anhaftenden Knochensplitter gereinigt, in der Schale zerrieben, sodann die doppelte Gewichtsmenge Ätherwasser langsam dem Brei zugesetzt, am Schüttelapparat kurz geschüttelt, durch dicke Lagen Gaze koliert, zentrifugiert, sodann die oberste schmierige Schichte mit einem Löffel oder Spatel abgehoben, die blutrote Lösung (Mittelschichte) abgegossen, der feste rotbraune Rückstand mit der abgehobenen obersten Schichte neuerdings in Ätherwasser fein zerrieben, geschüttelt und dieser Vorgang 3 bis 4 mal wiederholt, bis die Extrakte nicht mehr rotgefärbt, sondern nur durch aufgeschwemmte Zellen getrübt erschienen.

Die beiden festen Schichten (Bodenschicht und obere) wurden dann zur Entfernung des Äthers einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann in 200 bis 500 ccm neutrale gesättigte Trypsinlösung (Merck) gebracht, der sie unter Toluolzusatz in der Wärme ausgesetzt blieben.

Meist genügte eine 24stündige Digestion, um reine Präparate zu gewinnen<sup>2)</sup>.

Die Präparate wurden sodann zentrifugiert, der Rückstand mit Wasser, dann Alkohol und Äther gewaschen, über Schwefelsäure getrocknet.

---

<sup>1)</sup> Über die Abscheidung krystallisierten Hämatins bei der tryptischen Spaltung des Hämoglobins soll an anderer Stelle berichtet werden.

<sup>2)</sup> Wo eine andere Digestionsdauer gewählt wurde, finden sich stets im Texte bezügliche Angaben.

Als Ausgangsmaterial diente rotes Knochenmark erwachsener Pferde aus den großen Röhrenknochen. Es konnte für chemische Zwecke erst ein bis mehrere Tage nach der Schlachtung des Tieres, unmittelbar im Anschluß an die Ausschrotung des Tieres zu Verkaufszwecken gewonnen werden. Gleichwohl war das Material nie verdorben.

Die so gewonnenen Granulapräparate boten im mikroskopischen Bilde große Ähnlichkeit mit dem aus dem peripheren Blute von mir dargestellten eosinophilen Granulis. Insbesondere zeigten sie das gleiche physikalische Verhalten und die gleiche Resistenz gegen Lösungsmittel. Die getrockneten Präparate stellten ein feines Pulver dar, von gelbroter bis dunkelziegelroter oder auch rotbrauner Farbe. Sie lösten sich in kalter Salzsäure kaum, beim Erwärmen jedoch sehr gut. Carbonatlösungen lösten auch in der Wärme schlecht, Natronlauge bereits in der Kälte, vollständig beim Erwärmen.

Beim Erwärmen am Platinblech blähten sich die Präparate auf, schwärzten sich und verbrannten unter Hinterlassung einer kupferroten Asche.

Trotz der weitgehenden Isolierung (siehe mikroskopischer Teil) wird man in diesen Präparaten keine rein dargestellte Granula, sondern ein an Granulasubstanz möglichst angereichertes Präparat erblicken müssen, da die zahlreichen Verklebungen Einschlüsse fremder Massen bedingen können. Immerhin ist die bei mehreren Präparaten erreichte Phosphorfreiheit eine Gewähr für weitgehende Isolierung (besonders von Kernbestandteilen).

## II.

### Chemisches Verhalten.

Von allen durch die Reingewinnung analysenfähiger Mengen Granulasubstanz der Lösung nahegebrachten Fragen war die nächstliegende wohl die nach der vorliegenden organischen Substanz; ihre Beantwortung mußte uns auch darüber Aufschluß geben, welcher Gruppe von Bausteinen des Organismus diese Gebilde zuzureihen sind.

Die Präparate verbrannten mit deutlichem Horngeruch und ließen bei Behandlung mit Natronlauge in der Wärme Ammoniak frei werden. Es war somit Stickstoff anwesend.

Bei Veraschung mit Natriumsuperoxyd nach Asboth-Düring erwiesen sich alle drei darauf untersuchten Präparate als schwefelhaltig.

Dem alleinigen Nachweis dieser Elemente in einem aus dem Tierkörper abgeschiedenen und unvollständig gereinigten Präparat kommt keine sehr große Bedeutung zu. Weit ausschlaggebender mußten die quantitativen Verhältnisse ins Gewicht fallen.

Auf ihren Stickstoffgehalt wurden drei Präparate untersucht.

Präparat I (Ausgangsmenge 200 g Knochenmark, beschriebene Darstellung) ergab in 0,14 g 0,017 g N (12,2%).

Präparat II (300 g Mark, Digestion mit Trypsin 14 Tage) ergab in 0,1837 g 0,028 g N (15,2%).

Präparat III (500 g Mark, Digestion erst 24 Stunden, dann neuerdings 48 Stunden mit neuer Trypsinlösung) ergab in 0,089 g 0,0108 g N (12,1%).

Wie man sieht, zeigen die Präparate einen Stickstoffgehalt, der recht auffallend nahe an dem der Eiweißsubstanzen liegt.

Vom Präparat I wurde auch eine Schwefelbestimmung nach Asboth-Düring durchgeführt.

0,170 g ergaben 0,0213 g BaSO<sub>4</sub> (1,7% S).

Auch bezüglich des Schwefelgehaltes fällt somit die Substanz ganz in den Rahmen der Proteinstoffe.

Das Resultat dieser Analysen läßt es entschieden als unwahrscheinlich erscheinen, daß die Hauptmasse oder auch nur ein wesentlicher Anteil der Granulasubstanz einer stickstofffreien Komponente angehört. Diese Zahlen verweisen uns vielmehr in das Gebiet des Eiweiß-Stoffwechsels; und zwar spricht die gleichzeitige Anwesenheit von Stickstoff und Schwefel in dem den Eiweißkörpern zukommenden Prozentgehalt wohl sehr dafür, daß hier eine den Proteinstoffen selbst zuzurechnende Substanz vorliegt.

Ich prüfte die Substanz weiterhin auf das Vorhandensein von Phosphor, indem ich bei einer ganzen Darstellung aus ca. 100 g Knochenmark das feuchte Präparat einer Schmelze mit Soda und Salpeter unterzog, wobei sich zeigte, daß in der Schmelze mit molybdänsaurem Ammon kein Niederschlag erzielt werden konnte. Das Präparat war somit phosphorfrei<sup>1)</sup>.

Fielen die Ergebnisse der Analysen sehr zugunsten der Eiweißnatur der Granula in die Wagschale, so erforderte ein

---

<sup>1)</sup> Gleiches Ergebnis lieferten drei weitere Präparate (siehe S. 100).



exakter Eiweißnachweis noch weitere Bestätigungen. Vor allem mußte es gelingen, an Lösungen der Granula charakteristische Eiweißreaktionen nachzuweisen. Dieser Nachweis scheiterte zunächst an der durch den Eisengehalt bedingten Eigenfarbe der alkalischen Auflösungen. Es gelang jedoch, durch Spaltungen albumosenartige Substanzen, vom Eisen getrennt, zu erhalten, die überzeugende Eiweißreaktionen gaben.

Präparat IV aus 560 g Mark, gewöhnliche Darstellung, 24 Stunden digeriert. Das feuchte Sediment wurde zunächst zur Entfernung beigemengter löslicher Eiweißstoffe 15 Minuten in 10%iger Natriumcarbonatlösung bei 40° digeriert, zentrifugiert, das Sediment neuerlich mit Carbonatlösung behandelt und dieser Vorgang noch zwei weitere Male wiederholt, bis die letzte Carbonatlösung farblos blieb.

Der abzentrifugierte Rest wurde 10 Minuten mit siedender Natronlauge behandelt, nach dem Erkalten zentrifugiert (minimaler Rückstand).

Die tiefdunkle Lösung wurde mit Essigsäure neutralisiert und von dem nicht sehr reichlichen Niederschlag abfiltriert. Die lichtgelb gefärbte Flüssigkeit gab beim Sättigen mit Ammonsulfat eine ziemlich reichliche schmutzige Fällung, die sich nach ihrer Abscheidung (Nutsche) in Wasser zu leichtgelblicher Lösung löste. Letztere ergab eine reichliche Fällung mit:

Pikrinsäure,  
Kupferacetat,  
Sublimat,  
Eisenchlorid.

Essigsäure und Ferrocyankali erzeugten eine leichte Trübung.

Die Lösung ergab eine sehr starke Millonreaktion. Beim Versetzen mit Salpetersäure in der Kälte trat eine geringe Gelbfärbung auf, die jedoch beim vorsichtigen Erwärmen nicht zunahm und bei nachträglichem Zusatz von Natronlauge verschwand.

Durch Versetzen der Lösung mit Lauge und Übersichten mit verdünnter Kupfersulfatlösung erhielt ich einen breiten und intensiv rotviolett gefärbten Ring.

Die Schwefelbleiprobe war negativ. (Kochende Lauge!)

Die wiederholte Reinigung der Substanz durch Natriumcarbonat läßt es ausgeschlossen erscheinen, daß in ihr Reste von den leichtlöslichen Zellbestandteilen zurückgeblieben seien. Wir können somit die recht deutlichen Eiweißreaktionen nur auf Albumosen beziehen, die durch die siedende Kalilauge aus den schwerlöslichsten Anteilen der Granula abgespalten worden waren. Es spricht somit das Ergebnis dieses Versuches für die Eiweißnatur der Granula.

Schließlich versuchte ich, zur weiteren Erhärtung der Eiweißnatur noch den Nachweis der charakteristischen kristalli-

nischen Spaltungsprodukte unter den Produkten der Zersetzung der Granulasubstanz zu erbringen.

Präparat V. Ausgangsmaterial 1600 g Mark, in 6 Portionen verarbeitet, 24 Stunden digeriert.

Von dem lufttrockenen Präparat (8,3 g Gesamtmenge) wurden 5 g in zwei gleichen Teilen mit je 10 ccm konzentrierter Salzsäure am Ölbad mit Steigrohr 6 Stunden gekocht, sodann 4mal im Vakuum bei 45° mit erneutem Wasserzusatz eingedampft, vom reichlichen schwarzbraunen Niederschlag abgegossen, mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht, wobei ein reichlicher braunroter Niederschlag entstand. Letzterer wurde nach 24 Stunden abgenutscht und auf Tyrosin verarbeitet. Das Filtrat ließ beim Eindampfen auf ca. 100 ccm nochmals typische Tyrosinnadeln ausfallen, von denen abfiltriert wurde, worauf die Flüssigkeit 24 Stunden in der Kälte stehen blieb; es fiel nichts mehr aus.

Beim weiteren Eindampfen derselben auf wenige Kubikzentimeter erstarrte sie, und es ließen sich mikroskopisch außer Kochsalzkrystallen typische Leucinkugeln nachweisen. Das Präparat wurde in wenig Wasser gelöst, eingedampft und schied beim Erkalten reichliche weiße Krystallblättchen ab, deren Menge (Nutsche, Trocknen über Schwefelsäure) 1,03 g betrug.

Die Masse wurde weiterhin in wenig Wasser gelöst, mit Kupfercarbonat  $\frac{1}{4}$  Stunde lang gekocht, unter Ersatz des Wassers, sodann abgenutscht, eindampfen gelassen, bis sich blaßblaue Schüppchen abschieden. Diese wurden nach vollständiger Abscheidung 2mal aus siedendem Wasser umkrystallisiert, getrocknet und gewogen. Ihre Menge betrug 0,1535 g. 0,0435 g ergaben 0,0135 g Asche.

Die vereinigten, Tyrosin enthaltenden Niederschläge wurden wiederholt ausgekocht, das Filtrat mit Tierkohle entfärbt und auf wenige Kubikzentimeter eingedampft. Nach 24 Stunden auf gewogenem Filter gesammelt, mit Eiswasser gespült, über Schwefelsäure getrocknet. Die Menge betrug 0,022 g. Der Schmelzpunkt lag bei 265°. Die charakteristischen Nadeln gaben sehr starke Millonreaktion.

Die geringe Ausbeute bei diesem Versuch läßt es allerdings wünschenswert erscheinen, denselben mit größeren Substanzmengen und geeigneteren Methoden zu wiederholen.

Immerhin sind nachweisbare Mengen von Leucin und Tyrosin aufgefunden worden.

Fassen wir die Resultate der vorstehenden Versuche zusammen, so haben wir in der Granulamasse eine Substanz vor uns, die den Stickstoff- und Schwefelgehalt eines Eiweißkörpers aufweist, die bei Behandlung mit kochender Kalilauge eine albumosenartige Substanz mit echten Eiweißreaktionen abspaltet und bei Säurezerkochung Leucin und Tyrosin liefert.

Diese Tatsachen sowie das einer hochmolekularen Substanz entsprechende physikalische Verhalten lassen wohl keine andere Deutung zu, als daß hier ein Eiweißkörper<sup>1)</sup> vorliegt. Dabei muß es sich aber um eine anscheinend bisher an anderen Geweben noch nicht angetroffene eigenartige, phosphorfremde Proteinsubstanz handeln, die durch ihr kennzeichnendes physikalisches Verhalten, die Schwerlöslichkeit und die Resistenz gegen Fermente in chemischer Hinsicht, tinktorell hingegen durch ihre Beziehung zu sauren Farbstoffen gekennzeichnet ist. Durch die Schwerlöslichkeit und Unverdaulichkeit reiht sich die Substanz am ehesten dem Elastin oder den Hornsubstanzen an.

#### Aschensubstanz.

Sämtliche daraufhin untersuchten Präparate hinterließen beim Verbrennen eine kupferrote Asche. Die Menge derselben war eine ziemlich große. Bei zwei Präparaten ermittelte ich dieselbe.

Präparat VI (300 g Mark nach vorheriger Extraktion mit Atherwasser erst 24 Stunden mit neutraler, dann mit 0,5% Soda enthaltender Trypsinlösung verdaut).

0,0680 g geben beim Veraschen im Platintiegel 0,0075 g (11,0%).

Präparat III (s. oben).

0,0897 g geben 0,0165 g (18,4%).

Die Asche löste sich in verdünnter Salzsäure mit hellgelber Farbe auf. Beim Versetzen dieser Lösung mit Ammoniak schied sich ein rotbrauner, flockiger Niederschlag ab, der sich auf Zusatz von Schwefelammon schwarz färbte.

Die Lösung gab intensive Eisenreaktionen (dunkelblaue Färbung der salzsauren Lösung mit Ferrocyankalium). Es war somit Eisen nachgewiesen.

Das ammoniakalische Filtrat vom Eisenhydroxyd enthielt reichlich Kalk, wie sich durch Zusatz von Kaliumoxalat nachweisen ließ. Spektroskopisch konnten überdies Kali und Natron nachgewiesen werden.

<sup>1)</sup> Diese Ergebnisse der chem. Analyse stehen in Einklang mit dem positiven Ausfall histochemischer Eiweißreaktionen bei Untersuchungen von Weiß und vom Verf. (l. c.).

Bedenkt man die Herkunft der Präparate und ihre Darstellung, so wird man den Verdacht nicht vollständig abweisen können, daß der Kalkgehalt nicht der Granulasubstanz an sich, sondern einer Beimengung von der Knochensubstanz her angehört. Ganz anders verhält es sich hinsichtlich des Eisengehaltes. Quantitative Bestimmungen zeigten nämlich, daß derselbe ein sehr bedeutender ist.

Dieselben wurden ausgeführt bei phosphorfreien Präparaten durch Fällung des Eisenhydroxyds aus der salzsauren Lösung mit Ammoniak in der Wärme und Glühen des erhaltenen Niederschlages. Bei jenen Präparaten, in denen sich noch Spuren Phosphorsäure nachweisen ließen<sup>1)</sup>, wurde die Asche in schwefelsaurer Lösung mit Zink reduziert und dann nach Marguërite mit Chamäleonlösung titriert.

Präparat VIII (200 g Mark nach Extraktion 48 Stunden mit neutralem Trypsin digeriert).

0,181 g ergeben 0,021 g Fe (11,6%).

Präparat VII (300 g Mark nach Extraktion mit Ätherwasser 6 Tage lang digeriert mit neutralem Trypsin).

0,2228 g ergeben 0,0217 g Fe (9,7%).

Präparat VI.

0,068 g ergeben 0,0036 g Fe (5,3%).

Präparat III.

0,0765 g ergeben 0,0088 g Fe (11,4%) und

0,0512 g ergeben 0,0056 g Fe (11,0%).

Bei der sorgfältigen Entfernung des Hämoglobins vor Darstellung der Präparate ist es überhaupt unwahrscheinlich, daß der Eisengehalt der Präparate von Resten beigemengten Hämoglobins herrühre. Diese auffallend hohen Analysenzahlen jedoch, die sogar den Gehalt des reinen Hämatins an Eisen übertreffen, lassen eine solche Möglichkeit ganz ausgeschlossen erscheinen. Zweifellos handelt es sich also um einen den Präparaten als solchen zukommenden Eisengehalt, und dies ist gewiß der bedeutsamste der hier angeführten chemischen Befunde, da bereits seit langem mancherlei histochemische sowie pathologische Beobachtungen<sup>2)</sup> auf eine innige Beziehung des Hämoglobins zur Substanz der eosinophilen Granula hinweisen.

<sup>1)</sup> Schmelze mit Soda und Salpeter, molybdänsaures Ammon.

<sup>2)</sup> Literatur s. bei Weidenreich, l. cit. 100ff.

Um so wichtiger war nun die Entscheidung über die Art der vorliegenden Eisenbindung.

Bringt man Granulapräparate in kalter Salzsäure zur Auflösung, so läßt sich mit Schwefelammon die Gegenwart ionisierten Eisens in dieser Lösung nachweisen, ja bereits die unveränderten Granulapräparate schwärzen sich bei Zusatz von Ammonsulfid und nehmen mit Ferrocyankalium-Salzsäure dunkelblaue Farbe an. Es muß also bereits das unveränderte Präparat leicht ionisierbares Eisen enthalten.

Recht überraschende Befunde lieferte nun die mikroskopische Untersuchung solcher mit Eisenreagenzien behandelter Präparate. Dabei zeigte sich, daß die Färbung nicht das ganze Präparat gleichmäßig betraf, sondern daß ein Teil der Granula von der Färbung vollkommen freigeblieben war. Eine Entscheidung über die Beziehung dieser beiden verschiedenartigen Anteile meiner Präparate konnte natürlich nur auf dem Wege eingehenderer mikroskopischer Untersuchung erfolgen.

Selbst wenn letztere eine einheitliche Entstehung beider Bestandteile ergab, so war doch das Vorhandensein zweier verschiedenartiger Anteile in meinen Präparaten geeignet, den Wert meiner Analysen ganz bedeutend zu beeinträchtigen, da dieselben eben nicht an einer einheitlichen Substanz ausgeführt waren. Bezüglich des Eisengehaltes bestand aber noch die weitere Möglichkeit, daß das Eisen überhaupt nicht den Granulis selbst, sondern einer andersartigen Beimengung<sup>1)</sup> meiner Präparate zukomme, eine Möglichkeit, die durch den stark wechselnden Eisengehalt der Präparate an Wahrscheinlichkeit gewann. Es mußte also vor allem erst durch die mikroskopische Untersuchung darüber Klarheit gewonnen werden, ob der eosinophilen Substanz als solcher ein Eisengehalt zukommt.

### III.

#### Mikroskopisches Verhalten.

Ich lasse nun zunächst eine Beschreibung des mikroskopischen Verhaltens der mit Trypsin dargestellten Präparate,

<sup>1)</sup> Die Präparate waren durch Verarbeitung regenerativen roten Röhrenmarkes gewonnen worden, mußten somit nicht vollends normalen Verhältnissen entsprechen; um so eher konnte an das Vorhandensein von Hämosiderin anderer Provenienz gedacht werden.

dann eine Schilderung der nativen Knochenmarksausstriche folgen.

Mit Trypsin verdautes Präparat. Gewöhnliche Darstellung, 4 Wochen lang mit neutralem Trypsin in der Wärme digeriert, sodann zentrifugiert und feucht untersucht.

Das Präparat besteht nur mehr aus Granulis, die übrigen morphologischen Bestandteile des Knochenmarkes sind verschwunden.

Die einzelnen Granula zeigen bezüglich Größe und Form Ähnlichkeit mit den aus dem Pferdeblut gewonnenen Bildern. Doch liegen sie viel seltener isoliert, zumeist sind sie in Form von Aggregaten, die die Gestalt der Markzellen nachahmen, ohne daß außer den Granulis noch ein Zellrest sichtbar wäre. Letztere sind einfach untereinander verklebt. Stellenweise liegen verklebte Granulahaufen vor, bei denen nicht mehr die Form der Zelle erhalten ist.

Dabei finden sich alle Übergänge vom einfachen Nebeneinanderliegen getrennter Kugeln, wie beim Kaviar, bis zu einem vollkommenen Verschmelzen derselben untereinander zu einem kompakten großen Tropfen, an dem nur vorragende Buckel die Reste der ursprünglichen Granula erkennen lassen (s. Tafel I Fig. 1).

Die Färbung wechselt; einzelne sind vollkommen farblos hyalin, die meisten gelbgrün bis gelbrot, andere vollkommen fuchsrotbraun. Zumeist sind die konfluerten Tropfen braunrot gefärbt. Die einzelnen Granula eines Haufens haben stets gleiche Farbe.

Verdünnte wässrige Eosinlösungen färben die hellen hyalinen Formen carmoisinrot. Die braunen Formen nehmen die Farbe nicht so deutlich sichtbar auf. Bei den dunkelsten, fuchsroten Kugeln läßt sich nicht entscheiden, ob sie die Farbe aufgenommen haben.

Jodjodkaliumlösung färbt alle Granula gleichmäßig dunkelbraun.

Es verschwindet dabei der Farbenunterschied zwischen den einzelnen Gebilden.

Millons Reagens färbt beim Erwärmen die farblosen hyalinen Granula intensiv rot. Die Färbung ist bereits makroskopisch deutlich erkennbar.

Am charakteristischsten war das Verhalten gegen Eisenreagenzien.

Schwefelammonium färbt bereits makroskopisch kenntlich schwarzgrün. Im mikroskopischen Bilde zeigt sich diese Färbung ungleichmäßig verteilt. Die im nativen Präparate rotbraun und fuchsrot gefärbten Gebilde waren vollkommen opakschwarz, die hyalinen Formen zumeist farblos, vollkommen unverändert. Dazwischen gab es aber reichliche Übergänge, z. B. Granula mit grüngrauem Farbenton oder dunkler gefärbte, noch nicht ganz opake. Besonders deutlich waren diese Übergänge zu sehen nach etwa 12stündiger Einwirkung des Schwefelammons. Es bestanden daneben aber noch immer vollständig ungefärbte, unveränderte Gebilde.

Ähnliche Befunde lieferten Ferrocyankalium und Salzsäure, sowie Rhodanlösungen: ebenfalls eine ungleiche Färbung des Präparates mit

vorzüglicher Beteiligung der im nativen Präparate rotbraun gefärbten Gebilde. Besonders schön zeigte sich aber bei einzelnen der hyalinen Granula eine Bläßrosafärbung unter Rhodanwirkung.

Die Untersuchung der nativen Knochenmarksausstriche, zu denen zwei 4 bis 5 Stunden nach der Tötung gewonnene Präparate von rotem Röhrenmark, sowie unmittelbar nach der Tötung gewonnenes Wirbelmark verwendet worden war, bestätigte vor allem das Vorkommen von ionisiertes Eisen enthaltendem Granulis im unverdauten Knochenmark.

Frische Präparate, die ohne Fixation mit einem Tropfen Ammonsulfidlösung eingeschlossen wurden, zeigten rasch auftretende Schwärzung der konfluerten und verklebten Körnchenkugeln, genau wie bei den durch Trypsin verdauten Präparaten. Außer diesen ganz intensiv schwarzen opaken Gebilden fanden sich aber auch an einzelnen nicht konfluerten Granulis einzelner Zellen deutliche schwache Färbungen mit Ammonsulfid (graugrüne bis rauchgraue Tinktion sämtlicher Granula einzelner Zellen). Es ließen sich also auch hier Übergänge zwischen den vollständig ungefärbten und den ganz schwarzen Partien auffinden.

Im gänzlich ungefärbten Nativpräparate hatten die Körnchenkugeln eine deutlich gelbrote Farbe und zeichneten sich so von den wasserhellen eosinophilen Granulis aus<sup>1)</sup>. Auch kam ihnen ein weit größeres Lichtbrechungsvermögen zu.

Die größten Unterschiede zwischen beiden Granulaarten bestanden bei Doppelfärbungen (Fixation in Methylalkohol 3 Minuten, Färbung mit neuer Giemsalösung 10 bis 15 Minuten).

Dabei nahmen die Körnchenkugeln im Gegensatz zu den apderen eosinophilen Granulis eine deutlich basische Färbung an. Ihre Farbe wechselte zwischen blaugrün bis gelbgrün. Sie zeichneten sich auch hier durch bedeutend stärkeres Lichtbrechungsvermögen und vielfach auch durch eckige, an Malagatrauben erinnernde, wie geschrumpft aussehende Formen von den schön rot gefärbten, rundlichen, mattglänzenden eosinophilen Granulis aus. Die Zellen zeigten einen Kern von gleicher Bläschenform und gleicher Chromatinstruktur wie die echten eosinophilen Markzellen. Häufig ließ sich jedoch unter den dicht verklebten Gebilden kein Kern mehr nachweisen.

Trotz der bei Doppelfärbungen viel ausgesprocheneren Differenz zwischen diesen beiden Gebilden konnte die gleiche Form der Zellen, die gleiche Lagerung der Körnchen um den Kern herum in Form eines Halbmondes, die gleiche Spärlichkeit des Plasmas, die beiden Gebilden

---

<sup>1)</sup> Weidenreich (Die Leukocyten, S. 79) gibt an, daß die Färbung der Granula besonders gut am frischen Zupfpräparate des Knochenmarks hervortrete. — Arnold sah bereits im Kaninchenmark zu Tropfen konfluerte Granula (Virchows Archiv 140).

zukommende Neigung zur Konfluenz uns den Eindruck der Zusammengehörigkeit beider erwecken, der durch manche Bilder, die sich als Übergänge deuten ließen, verstärkt wurde. So fanden sich z. B. vollständig runde, mattglänzende Kügelchen neben stark geschrumpften, stärker lichtbrechenden von gleicher gelber Farbe in einer Zelle. Häufig konnte ich auch ein deutliches Abblassen einzelner Granula einer eosinophilen Zelle oder auch ein vollständiges Ungefärbtbleiben einzelner Granula einer eosinophilen Zelle bemerken.

Die Untersuchung der Knochenmarksausstriche ergab also einerseits Zellen, deren Granula sich nach jeder Richtung so verhalten, wie die eosinophilen Granula des peripheren Blutes: runde, mattglänzende, stark mit Eosin färbbare, auf Eisenreagenzien gar nicht ansprechende Granula.

Andererseits waren Zellen vorhanden, für die im Blute kein Analogon gefunden werden konnte. Ihre Granula zumeist konfluiert oder in Form geschrumpfter, stark lichtbrechender Schollen, nativ bereits rotbraun gefärbt, mit Eosin kaum färbbar, bei Doppelfärbungen sich basisch färbend, mit Schwefelammon intensiv sich schwärzend.

Trotzdem bereits das Verhalten dieser Gebilde bei Giemsa-Färbung, sowie ihr morphologisches Verhalten sie von den uns bekannten Granulis des peripheren Blutes tiefgehend unterscheidet, habe ich noch spezielle Untersuchungen ausgeführt über das Verhalten des Blutes von Pferden und Kranken mit myeloischer Leukämie. Ich konnte dabei niemals mit Eisenreagenzien bei kurzdauernder Einwirkung irgendwelche Färbungen erzielen. Die dunklen Körnchenkugeln besitzen also im peripheren Blute kein Analogon.

Die bei allen Arten der Beobachtung vorkommenden Übergangsformen zwischen beiden Arten von Gebilden läßt an einen Zusammenhang beider denken. Man gewinnt den Eindruck, daß sich die eosinophilen Granula in eine geschrumpfte, stärker lichtbrechende, spontan dunkler gefärbte, nicht mehr acidophile Masse mit starkem Gehalt an ionisierten Eisen umwandle<sup>1)</sup>.

Ganz unabhängig von der Frage nach der Zusammengehörigkeit der beiden Granulaarten beweisen aber jene sicher

<sup>1)</sup> Ich behalte mir eine eingehendere Darstellung der Beziehung beider Körnchenarten zueinander mit Wiedergabe von Bildern an anderer Stelle vor. Hier sollten die histologischen Verhältnisse nur insoweit dargestellt werden, als es notwendig war, um zu entscheiden, ob der chemische Eisennachweis in meinen Präparaten für die eosinophile Substanz maßgebende Bedeutung besitzt.



noch mit Eosin sich färbenden, die Form und das Lichtbrechungsvermögen echter eosinophiler Granula besitzenden Gebilde, die bereits in frischen Ausstrichpräparaten Eisenreaktionen geben, daß der eosinophilen Substanz ein Eisengehalt tatsächlich zukomme.

Das Verständnis der Beziehung beider Arten von Granulis in meinen Präparaten zueinander wäre sehr gefördert worden, wenn es gelänge, die auf Eisenreagenzien gar nicht ansprechenden Granula isoliert zur Untersuchung zu bringen und auf Eisen zu prüfen. Leider gelang es nicht, durch Zentrifugierung die verschiedenen Anteile meiner Granulapräparate voneinander zu trennen. Ich mußte daher diese Untersuchung an den eosinophilen Granulis der Polynucleären des peripheren Blutes anstellen, die ja vollständig frei von solchen sofort mit Eisenreagenzien sich färbenden Gebilden sind. Da eine Reingewinnung nur an Oxalatblut angestrebt werden konnte, und die Präparate in letzterem durch große Mengen von Calciumoxalat verunreinigt waren, konnte es sich nur um den qualitativen Nachweis von Eisen in den Präparaten handeln. Gleichwohl ermittelte ich quantitativ die in den Aschen vorhandene Eisenmenge, um auf diesem Wege nachzuweisen, daß ein quantitativ in Betracht kommender Anteil meiner Präparate auf Eisen entfalle. Ich verarbeitete dazu 30 l Pferdeblut.

Es wurden je 3 l Blut mit 100 ccm isotonischer Kaliumoxalatlösung aufgefangen, frisch in je zwei großen Zylindern nach Entfernung des Schaums durch 48 Stunden bei ausgiebiger Wasserkühlung mit Kork verschlossen gehalten. Danach wird das Serum bis auf 2 ccm abgehoben, die Leukocytschicht mit einer Friendschen Pipette abgehoben, was sich infolge des Zusammenklebens der Leukocyten sehr leicht gestaltete. Die gesamte, viel Serum und auch rote Blutkörperchen enthaltende Masse wird nun kräftig geschüttelt und lange und kräftig zentrifugiert. Es setzt sich nun die etwa kleinfingerbreite Leukocytschicht zwischen den roten Blutkörperchen und dem Serum ab. Dieselbe ist entweder homogen fleischfarben oder gesprenkelt, meist aber im oberen Anteil vollständig weiß. Sie wird nun von den roten Blutkörperchen getrennt abgehoben, sodann in ca. 40 ccm 1% iger Kochsalzlösung gebracht, kräftig geschüttelt und nun mit geringer Tourenzahl 3 Minuten zentrifugiert. Dabei bleiben die roten Blutkörperchen, die noch das Präparat verunreinigt hatten, in der oberen Lösung suspendiert, während die fast ganz weiß gewaschenen Leukocyten in allerdings nicht sehr kompakter Schicht den Boden des Zentrifugenrohres bedecken. Es wird nunmehr die rotgefärbte flüssige Suspension mit der Pipette entfernt und der eben ge-

schilderte Vorgang so lange wiederholt (4 bis 6 mal), bis beide Schichten vollkommen farblos geworden sind. Die so gereinigte schneeweiße Masse wird nochmals mit destilliertem Wasser gewaschen und nur dann weiter verarbeitet, wenn sie an dieses keinen Farbstoff mehr abgibt. Die Gesamtmenge wird sodann mit 50 ccm gesättigter, filtrierter Lösung von Pankreatin Rhenania versetzt und 24 Stunden lang bei 40° unter Toluolzusatz digeriert.

Die Gesamtmasse verarbeitete ich sodann in drei Portionen.

Die einzelnen Proben wurden zentrifugiert, die nicht sehr reichlichen grauweißen Zentrifugate schließlich zu drei Proben vereint, die gesondert verarbeitet wurden. Eine mikroskopische Untersuchung der Proben ergab, daß dieselben aus reichlichen Oxalatkrystallen und Granulis bestanden, die zum Teil frei, zum größten Teile zu Aggregaten vereinigt waren. Dieselben reagierten bei kurzdauernder Behandlung mit Ammonsulfid gar nicht. Sie färbten sich mit Jodjodkali sehr intensiv. Die drei Proben wurden 3 bis 4 mal mit destilliertem Wasser gewaschen, dann mit Alkohol von steigender Konzentration, sodann mit Äther aufs Filter gebracht, über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

Probe A. Gesamtmenge 0,4030 g.

Die Gesamtmenge wird am Platintiegel geglüht, die Asche mit einigen Tropfen eisenfreier Salzsäure gelöst (leicht gelbliche Lösung), am Wasserbade abgedampft, mit Wasser aufgenommen, auf 100 ccm gebracht. Davon wurden

a) 50 ccm nach Marguérite titriert.

0,0028 g Eisen.

b) In 20 ccm wurde mit Schwefelsäure der Kalkgehalt ermittelt.

0,0345 CaSO<sub>4</sub>.

Der Rest gab auf Zusatz von Rhodan deutliche Rötung, auf Zusatz von Ferrocyankalium deutliche Grünfärbung.

Dem Kalkgehalt entsprechend entfiel auf Calciumoxalat (mit 3 Molekülen Krystallwasser) 0,219 g. Es entfällt somit auf Granulasubstanz 0,18 g. Der Eisengehalt beträgt dementsprechend 3‰.

Probe B, Gesamtmenge 0,104 g, wird verascht und nach Marguérite titriert. Eisengehalt 0,0044 g.

Probe C. 0,1672 g ergeben 0,0032 g Eisen.

Sämtliche drei Präparate waren auf das Vorhandensein von Hämatin durch Extraktion mit saurem Alkohol und weitere spektroskopische Untersuchungen des letzteren (Ammoniak, Hydrazinhydrat) geprüft und frei befunden worden.

Wie man sieht, läßt sich in der von Resten des Blutfarbstoffes vollkommen befreiten Substanz der eosinophilen Granula Eisen in analytisch meßbaren Mengen nachweisen. Die schätzungsweise Beurteilung der Menge bei Probe A läßt den Gehalt derselben an Eisen nicht gering anschlagen. Dieser Befund steht in gutem Einklang mit den histologischen Beobachtungen von Barker<sup>1)</sup>, der zeigte, daß durch protrahierte Behandlung der Blutpräparate mit Glycerin und Schwefelammon in der Wärme „verstecktes Eisen“ in den Granulis nachweisbar wäre, was allerdings Askanazy<sup>2)</sup> nicht bestätigen konnte. Przewosky<sup>3)</sup> hingegen konnte mit einer noch überzeugenderen Methode die Anwesenheit schwer abspaltbaren Eisens in den Granulis histologisch nachweisen.

Ich prüfte nun seine Befunde nach, indem ich das Oxalatblut dreier verschiedener Pferde abstehen ließ und nach 6 Stunden die Leukocytenschicht entnahm und Ausstrichpräparate anlegte, die 5 Minuten lang in Methylalkohol fixiert und in Ammonsulfidlösung, resp. in mit Salzsäure angesäuerte 10%ige Ferrocyankaliumlösung einlegt wurden. Ich konnte nun bei einem Blute bereits nach  $\frac{1}{2}$ stündiger Einwirkung der Reagenzien eine deutliche, wenn auch schwache Färbung der einzelnen Granula nachweisen, lichtblau bei Ferrocyankalium, graugrün bei Schwefelammon. Die Färbung betraf einzelne oder auch alle Granula einer Zelle. Viele Zellen hatten vollkommen ungefärbte Granula. Die beiden anderen Blutproben zeigten bei gleicher Behandlung (auch nach 12stündiger Einwirkung von Ferrocyankalium) ein absolut negatives Resultat.

Die chemische Untersuchung hat somit in den primär auf Eisenreagenzien nicht ansprechenden echten eosinophilen Granulis des peripheren Blutes einen analytischen in Betracht kommenden Eisengehalt ergeben; die histologische Prüfung ergab, daß unter Umständen ein Teil dieses Eisens durch länger dauernde Einwirkung der Reagenzien abgespalten werden kann. In Übereinstimmung damit zeigen zahlreiche sicher der eosinophilen angehörige Granula des Marks mäßiggradige Färbung mit Eisenreagenzien. Es erscheint somit unabhängig von den

1) John Hopkins Hosp. Bull. 5, Nr. 42.

2) Münch. med. Wochenschr. 1904, Nr. 45.

3) Centralbl. f. allg. Path. 7.

dunkelroten Körnchenkugeln des Marks, die ja wohl der eisenreichste Bestandteil desselben sein werden, auch in den echten eosinophilen Granulis ein gewisser Eisenvorrat gegeben.

Da die vorstehend geschilderten Versuche die Anwesenheit fester gebundenen Eisens in der eosinophilen Substanz wahrscheinlich gemacht hatten, war es nunmehr geboten, auf das Vorhandensein von Hämatin in den Granulis zu prüfen, einer Substanz, die für die zelligen Elemente des Blutes als die nächstliegende Form fester Eisenbindung in Betracht käme. Wird doch schon seit jeher sowohl auf Grund färberischer Ähnlichkeiten als mit Bezug auf mannigfache Beobachtungen aus der Pathologie eine Verwandtschaft zwischen dem Hämoglobin und der Granulasubstanz angenommen.

Ich habe nun bei zahlreichen Präparaten diesbezügliche Untersuchungen angestellt, indem ich mit den unveränderten Präparaten oder nach vorhergehendem Kochen mit Eisessig die Häminprobe anstellte, oder indem ich salzsaure alkoholische Extrakte herstellte, diese mit Ammoniak alkalisch machte und nach Reduktion mit Hydrazinhydrat spektroskopisch untersuchte. Es gelang mir dabei nie, aus Präparaten, bei deren Darstellung das Mark vor der Verdauung hinreichend vom Hämoglobin befreit worden war, Häminkrystalle zu gewinnen<sup>1)</sup> oder den charakteristischen Absorptionsstreifen des Hämochromogens zu erhalten, obwohl Zusatzversuche zeigten, daß die Anwesenheit der Granulasubstanz die Empfindlichkeit beider Methoden nicht beeinträchtigte. Ich will aus den Versuchen hier einen mitteilen.

300 g frisch bezogenes rotes Mark wurde mit kaltem Wasser verrieben, geschüttelt, zentrifugiert, abgossen, abermals mit Wasser behandelt. Nach 3maliger Wiederholung dieses Vorgangs ist das Wasser nur mehr durch suspendierte Zellen getrübt. Der Rückstand wird mit 500 ccm gesättigter Lösung von Merckschem Pankreatin unter Toluolzusatz 4 Tage lang verdaut, sodann zentrifugiert. Der rötlichbraune Niederschlag gibt bei Anstellung der Teichmannschen Probe am Objektträger ein negatives Ergebnis. Auch nach vorherigem Aufkochen einer

---

<sup>1)</sup> Przewoskys (l. c.) gegenteiliges Ergebnis ist somit aus der von ihm selbst als Fehlerquelle in Betracht gezogenen Verunreinigung mit Erythrocyten zu erklären.

Probe mit Eisessig gelingt die Häminprobe nicht. Ein Teil wird mit wenig konzentrierter Salzsäure versetzt, sodann Alkohol zugegeben, kurz aufgekocht, nach dem Erkalten ammoniakalisch gemacht. Die leichtgelbliche Lösung zeigt auf Zusatz von Hydrazin keine Farbenänderung und keinen Hämochromogenstreifen.

Ein anderer Teil wird mehrere Stunden lang in der Kälte mit Salzsäure behandelt, sodann 3 Minuten hindurch im Kochen erhalten. Nach dem Abkühlen wird ein Teil dieser Probe mit Alkohol versetzt, ammoniakalisch gemacht und wieder auf das Vorhandensein von Hämochromogen geprüft. Es ließ sich auch hier nicht nachweisen, trotzdem im Rest der Probe durch Eintragen in Wasser, Neutralisation mit Lauge und Sättigung des Filtrats vom Neutralisationsniederschlag mit Ammonsulfat reichlich Albumosen nachgewiesen werden konnten.

Es gelingt somit unter Bedingungen, bei denen die Granulapräparate in Lösung gehen und sogar aus den Eiweißsubstanzen Albumosen abgespalten werden, nicht, Hämatin nachzuweisen. Wir können somit kaum annehmen, daß die Granula Hämatin in einer analogen Bindung, wie sie das Hämoglobin zeigt, enthalten.

Das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung berechtigt uns somit, einen Teil des gefundenen Eisengehaltes unserer Präparate auf die wohl erhaltenen eosinophilen Granula des Marks zu beziehen, und wir müssen der früher entworfenen Charakteristik der eosinophilen Substanz als eines durch seine physikalischen Eigenschaften, die Schwerlöslichkeit und Resistenz gegen Trypsin sowie durch die Acidophilie gekennzeichneten Eiweißkörpers noch das weitere, wesentliche Merkmal beifügen, daß sie Eisen in einer nicht durch Hämatin vermittelten festen Bindung enthält, die aber eine gewisse Labilität besitzt, so daß ein Teil des Eisens durch längere Einwirkung von Eisenreagenzien, durch Trypsin, aber auch durch im Organismus selbst wirksame Einflüsse abgespalten werden kann.

#### IV.

##### Herkunft und biologische Bedeutung der eosinophilen Substanz.

So unvollständig auch die vorliegenden Resultate sind, so bringen sie doch bereits neues Material zur Beurteilung einiger die Granula betreffenden Fragen bei.

Zunächst bestätigt der nunmehr durch exakte chemische Methoden erbrachte Eisennachweis die seit längerer Zeit bestehenden Vermutungen über eine Beziehung dieser Gebilde zum Hämoglobin. Die vorliegenden Befunde gestatten auch ein Urteil über die Art dieser Beziehung. Insbesondere können wir die Frage, ob die Granula unverändertes Hämoglobin oder ein nahes Umwandlungsprodukt desselben darstellen (Weidenreich) oder ob sie eine nicht aus Hämoglobin hervorgehende selbständige Bildung des Leukocytenplasmas (Pappenheims<sup>1</sup>) „rudimentäres Hämoglobin“ sind, nunmehr einer erneuerten Beurteilung unterziehen.

Es handelt sich bei beiden Substanzen um eisenhaltige Eiweißkörper. Das chemische Verhalten der Granulasubstanz weicht jedoch in vielen wesentlichen Punkten vom Hämoglobin und seinem Spaltungsprodukt, dem Globin, ab: im physikalischen Verhalten, in der Löslichkeit, im Verhalten gegen Fermente.

Sicherlich sind die beiden ersterwähnten Momente nicht so wesentlich<sup>2</sup>), daß nicht doch ein Übergang aus dem leicht löslichen Hämoglobin in die Granulasubstanz auf dem Wege einer einfachen Fällungsreaktion denkbar wäre (Paracasein — Paracasein-Kalk). Die Resistenz gegen Fermente jedoch verweist den Eiweißkörper überhaupt aus der Gruppe des Hämoglobins in die Nähe anderer, im Blute und seinen Bildungsstätten gar nicht vertretenen Proteinsubstanzen (Horn, Elastin usw.).

Erscheint uns demnach bereits dadurch die Granulasubstanz als eine selbständige Bildung, so wird uns die Unmöglichkeit eines direkten Übergangs von Hämoglobin in eosinophile Substanz noch deutlicher bei Berücksichtigung der Art der Eisenbindung in beiden Eiweißkörpern: im ersteren durch Hämatin vermittelt, im letzteren anscheinend ohne Hämatin. Eine Bildung von Granulasubstanz aus Hämoglobin kann somit wohl nur einem Neuaufbau aus den Bausteinen gleichkommen. Unsere Befunde wären somit wohl am ehesten mit der Auffassung Ehrlichs in Einklang zu bringen, der in den Granulis eine Art Sekretsubstanz des Zellplasmas erblickt.

<sup>1</sup>) Pappenheim, Virchows Archiv 151.

<sup>2</sup>) s. a. Weidenreich, Die Leukocyten. S. 91.

Diese Feststellungen haben aber vorerst ausschließlich für das Substrat meiner Analysen, die eosinophilen Markzellen des Pferdeknochenmarkes, Geltung.

Beobachtungen von Weidenreich<sup>1)</sup>, der in den Blutlymphdrüsen des Schafs einen direkten Übergang von extracellular zerfallenden roten Blutkörperchen in Granula beobachtet, stehen daher in keinem Widerspruch zu meinen Resultaten, da erst weitere Untersuchungen mit Hilfe der Trypsinmethode zeigen müssen, ob wirklich sämtliche acidophil sich färbende granuläre Differenzierungen des Leukocytenplasmas in der ganzen Tierreihe chemisch und genetisch identische Substanzen darstellen. Kernanalytische Untersuchungen von Pappenheim<sup>2)</sup> lassen dies sogar recht unwahrscheinlich erscheinen.

Mit der Bestätigung der Ehrlichschen Auffassung der Granula als ein Zellssekret wird auch unser Interesse an einer anderen damit innig verknüpften Frage wieder erweckt. Ehrlich sah bei Mastzellen einen Austritt der Granula aus den Zellen und schloß daraus, daß erstere zu einer weiteren funktionellen Leistung berufen seien. Die Schwerlöslichkeit der eosinophilen Granula in den Körpersäften läßt einen derartigen Vorgang bei letzteren als einigermaßen erschwert erscheinen; es ist aber nicht ausgeschlossen, daß eine Prüfung der pharmakologischen Wirksamkeit meiner Substanz, die ich mir vorbehalte, ein positives Ergebnis liefern kann.

Immerhin lassen die Resultate der vorliegenden Untersuchung auch für eine andere vielfach vertretene Auffassung über die funktionelle Bedeutung der grobgranulierten Zellen Schlüsse zu. Die Eigenschaften derselben lassen sie nämlich in hervorragendem Maße geeignet erscheinen sowohl zum Transport als zur Deponierung von Eisen, und es kann möglicherweise das vielfach beobachtete Auftreten dieser Zellen bei Blutungen oder bei Muskelherden derart seine Erklärung finden.

Inwieweit dabei der Fähigkeit dieser Substanz, unter Auftreten von ionisiertem Eisen sich umzuwandeln, wie wir es z. B. im Knochenmark — an der Bildungsstätte des Hämoglobins — beobachten konnten, auch eine biologische Bedeutung zukommt, muß erst durch weitere experimentelle Untersuchungen erwiesen werden.

---

<sup>1)</sup> Anat. Anz. 20, 188.

<sup>2)</sup> Fol. haem. XI.

**Analytische Belege.****Präparat I.**

N-Bestimmung (Kjeldahl):

0,140 g verbrauchten 4,9 ccm  $\frac{1}{4}$ -Säure.

S-Bestimmung:

0,170 g lieferten 0,0213 g  $\text{BaSO}_4$ .**Präparat II.**

N-Bestimmung:

0,1837 g verbrauchen 8,0 ccm  $\frac{1}{4}$ -Säure.**Präparat III.**

N-Bestimmung:

0,0899 g verbrauchen 7,75 ccm  $\frac{1}{10}$ -Säure.

Fe-Bestimmung:

0,0512 g verbrauchen 0,7 ccm Chamäleonlösung.

**Präparat VI.**

0,068 g verbrauchen 0,45 ccm Chamäleonlösung.

**Präparat VII.**0,2228 g geben 0,0310 ccm  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .**Präparat VIII.**0,181 g geben 0,0302 ccm  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .**Eisennachweis in der Blutgranulis.**

Erste Portion (A).

50 ccm der Aschenlösung verbrauchen 0,35 ccm Chamäleonlösung.

Zweite Portion (B).

Die ganze Lösung verbraucht 0,55 ccm Chamäleonlösung.

Dritte Portion (C).

Die ganze Lösung verbraucht 0,4 ccm Chamäleonlösung.

Stellung der Chamäleonlösung (Sörensen).

0,1455 g  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  verbrauchen 15,2 ccm.



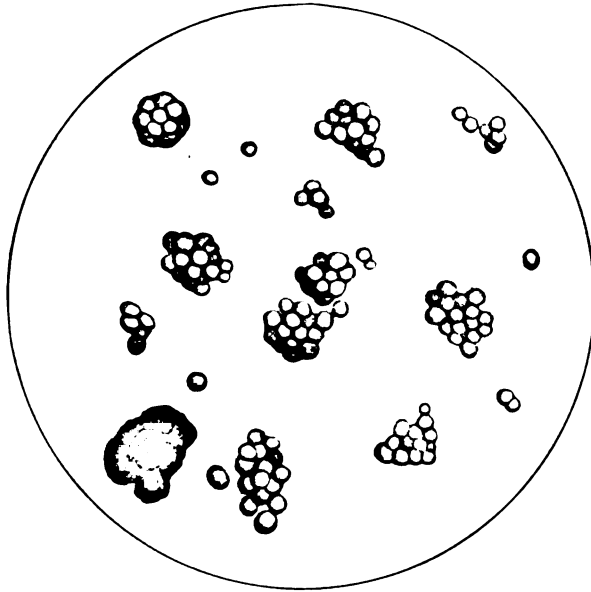


Fig. 1.



# Untersuchungen über die Topographie der Enzyme im Magen-Darmrohr der Fische.

Von  
Osw. Polimanti.

(Aus der physiologischen Abteilung der Zoologischen Station zu Neapel.)

(Eingegangen am 24. November 1911.)

Mit 6 Figuren im Text.

Zahlreiche Untersuchungen sind über die Enzyme des Magen-Darmrohrs der Fische [von Richet<sup>1)</sup> bis zu M. van Herwerden<sup>2)</sup>], namentlich aber über die Magenverdauung, angestellt worden; kein Autor hat sich jedoch, soviel ich weiß, mit dem Studium der Topographie der verschiedenen Enzyme in diesen Teilen beschäftigt.

Eine in jüngster Zeit von H. J. Hamburger<sup>3)</sup> ersonnene Methode hat mich auf den Gedanken gebracht, derartige Untersuchungen bei einigen Knorpelfischen (*Scyllium catulus* Cuv. und *Scyllium canicula* L.) sowie bei einigen Knochenfischen: *Box salpa* L. (Pflanzenfresser) und *Conger vulgaris* Cuv. (Fleischfresser) anzustellen.

Wie bekannt, verschlingen alle Selaohier ihrer Gewohnheit nach durch den Ösophagus, der aus einem verhältnismäßig kurzen und sehr weiten Rohr besteht, sehr umfangreiche Bissen; dies tut auch unter den von mir zum Zweck meiner Untersuchungen über die Magenenzyme untersuchten Teleostiern der *Conger vulgaris*. Sie kauen ihre Beute nie,

---

<sup>1)</sup> Le suc gastrique de l'homme et des animaux. Paris 1878. — Arch. de phys. norm. et pathol. 1882. — Travaux du laboratoire. Paris 1893.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 453 bis 494, 1908.

<sup>3)</sup> Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles. Sér. II. 13, 428, 1908.

sondern häufen im Magen während einer mehr oder minder langen Zeit Vorräte an, die darin erweicht und in eine breiartige Masse umgewandelt, zum Teil peptonisiert werden. Bei den Selaohiern gehen diese Speisen dann, nachdem sie in dem U-förmigen Magen verweilt haben, in ein sehr enges Rohr (den Pylorus), das je nach den verschiedenen Arten mehr oder minder lang ist, sich in seinem unteren Teile erweitert und in ein sehr langes Darmrohr mündet. Dieses ist verhältnismäßig kurz und zeigt eine schraubenförmig gewundene Biegung (spiralförmige Klappe), die die Aufgabe hat, den Durchgang der Nährstoffe gegen das Septum hin sehr zu verzögern, wo es aufhört und so die Absorptionsfläche des Darmrohrs beträchtlich vergrößert.

Beim Conger dagegen hat der Magen die Form eines wahren und eigentlichen Säckchens, in das die Nahrung durch die Kardie eintritt und sehr lange Zeit im Magen verweilt; sie steigt wieder von unten nach oben, kommt durch den Pylorus und geht dann durch das Darmrohr, das nicht sehr lang ist.

Bei *Box salpa* ist die Speiseröhre sehr kurz und geht ohne anscheinend äußere Grenzlinie in den Magen über. Letzterer hat die Gestalt eines nicht sehr umfangreichen länglichen Saokes. Das Darmrohr bildet in seinem Beginn eine kleine Zahl Schleifen von gleichmäßigem Kaliber und wird dann in seinem unteren Teile enger. In dem weiter unten nach dem Rectum hin gelegenen Teile ist konstant ein Kranz von Anhängen des Darmrohrs vorhanden; auf diese Weise wird die Absorptionsfläche vergrößert.

Der Anus öffnet sich nach außen in der Papilla ano-genito-urinaria.

Ich will nun die Methode Hamburgers, die ich bei diesen Untersuchungen verwendet und nur in einigen Einzelheiten abgeändert habe, kurz zusammenfassen.

Glasröhren von einem Innendurchmesser von ca. 9 bis 10 mm, die 25 bis 28 mm hoch waren, wurden leicht an einem Ende erwärmt und hierauf auf Paraffintischchen befestigt.

In jeden dieser in vertikaler Richtung angebrachten kleinen Zylinder wurden im Durchschnitt 3 cm Agar-Agargelatine gebracht. Nachdem die Gelatine fest geworden war, was nur wenige Minuten dauert, nahm ich mit einem kleinen Spatel etwas davon aus dem Glasröhrchen, in dem sie enthalten war, und brachte sie dann in horizontaler Richtung auf die verschiedenen Gegenden der Mucosa des Magen-Darmrohrs verschiedener Fische, das ich vorher geöffnet und vorbeugend mit Meerwasser gewaschen hatte, um den Schleim zu entfernen, der die Mucosa vielleicht bedeckte (Speisereste waren nie vorhanden, weil die Fische stets wenigstens 48 Stunden hungern mußten, wenn sie aus dem Meere gebracht worden waren).

Die Agarsäulchen blieben dann bei Umgebungstemperatur (15 bis 20°) in Kontakt mit der Mucosa, und zwar eine mehr oder minder lange Zeit hindurch, je nach dem Enzym, das extrahiert und studiert werden sollte; diese Zeit werde ich genau angeben, wenn ich von den Enzymen rede.

## I. Pepsin und Pepsinogen.

Die Säulen von neutralem Agar bleiben 12 bis 24 Stunden lang in Berührung mit der Magenschleimhaut der verschiedenen Fische; auf diese Weise gehen alle Enzyme und Proenzyme im Agar zugrunde.

Nachdem diese kleinen Gelatinesäulen von der Magenschleimhaut entfernt worden sind, werden sie in kleine Stücke verwandelt und mit 3 ccm einer 0,4 % igen HCl-Lösung vermischt.

Diese Suspension wird in kleine Flaschen gegossen und in jede werden zwei zylindrische Capillarröhren (Mett-Fermi) eingeführt, die koaguliertes Blutserum enthalten (Glässner hat zuerst erkannt, daß bei diesen Untersuchungen das Blutserum dem Eiereiweiß vorzuziehen ist). Nachdem man im Maximum 10 Stunden lang bei einer Temperatur von 36° in Kontakt gelassen hat, bestimmt man mit einer in Millimeter graduierten Skala die Menge verdauter Substanz an den beiden Enden der Säulchen von Blutserum; dann bringt man diese wieder in die Flüssigkeit und nimmt sie einige Stunden nachher wieder heraus, um zu messen. Wie Hamburger nachgewiesen hat, hindert das in der Flüssigkeit befindliche Agar durchaus nicht die Wirkung des Pepsins, in diesem Falle auf das Blutserum.

In einer Arbeit von Yung (1899)<sup>1</sup>) sind alle vor dieser Zeit angestellten Untersuchungen angeführt, die bezüglich der Magenenzyme der Fische ausgeführt wurden. Yung und Sellier<sup>2</sup>) behaupteten gleichzeitig (1899), das Magenenzym der Selachier, das imstande ist, Albumin zu spalten, sei identisch mit dem Pepsin der höheren Vertebraten. In jüngster Zeit dagegen behauptete Hammarsten<sup>3</sup>) (indem er sich auf Untersuchungen stützte, die er mit Magenaufguß von *Esox Lucius* angestellt hatte, den er bei Ofentemperatur in Anwesenheit einer 0,2 % igen HCl-Lösung aufbewahrte — dieser zersetzt sich leicht und seine Funktion und Wirkung hören sehr schnell auf —), bei den Fischen sei eben das Pepsin nicht vollkommen identisch mit dem der höheren Vertebraten, weil eben keine derartige Spaltung des Albumins eintrete. M. van Herwerden bestätigte, als sie die peptische Eigenschaft sowohl des Magensaftes als auch des Extraktes der Magenschleimhaut der Selachier in Anwesenheit von 0,5 % iger HCl untersuchte, was Yung

<sup>1</sup> Arch. de Zoologie expérimentale 1899.

<sup>2</sup>) Travaux des laboratoires d'Arcaachon 1899, 93.

<sup>3</sup>) Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 47, 1908.

gesehen hatte, daß nämlich das Eiweiß vom Huhn sehr langsam verdaut wird; sie verwendete deshalb bei quantitativen Untersuchungen die mit geronnenem Blutserum gefüllten Mettschen Röhren, und bei qualitativen Untersuchungen das Fibrin (gleichzeitig machte sie auch Kontrollproben mit HCl-Lösungen ohne Extrakt und mit gekochtem Extrakt).

Es bleibt noch kurz zu untersuchen, welchen Einfluß die (saure-alkalische) Reaktion ausübt und bis zu welchem Grade sie ihn ausüben kann, und auch wie die Temperatur die peptische Verdauung beeinflusst.

Auf diesem Gebiete zeigen sich einander sehr widersprechende Behauptungen. Nach Ch. Richet tritt die peptische Verdauung leichter ein in sauren Lösungen, die 10,15 und auch 20 ‰ HCl enthalten, als in 1, 1,5 und 2 ‰ enthaltenden (er fand, daß die Acidität des Magensaftes einiger Fische im Moment der Verdauung bei einigen Spezies bis auf 15 ‰ stieg).

E. Yung gibt mit 7 ‰ die für die Auflösung des Fibrins günstigste Menge an.

Sellier, der Versuche an vielen Selachiern und Teleostiern machte, fand sehr veränderliche Zahlen hinsichtlich der Gesamtacidität (bei *Soyllium canicula*, das auch den Gegenstand meines Studiums bildet), 6 bis 11,6 ‰. Er konnte nie freie HCl antreffen, wie sehr er dies auch mit Dimethylamidoazobenzol zu erreichen versuchte; die Milchsäurereaktion war stets negativ.

M. van Herwerden stellte in ihrer Arbeit alle Beobachtungen zusammen, welche die verschiedenen Autoren über die Acidität des Magensaftes bei den Fischen gemacht haben; sie sah, daß bei *Scyllium* das Optimum der Pepsinwirkung bei einer Acidität von 0,5 bis 1 ‰ HCl eintrat; auch bei 2 ‰ war das Enzym noch aktiv, während hingegen 4 ‰ ige HCl bei *Heptanchus* die Wirkung des Enzyms verhinderte. Sie bemerkte ferner, daß Milchsäure (Bestätigung der Beobachtung Weinlands) wie auch Essigsäure die HCl sehr wohl ersetzen können.

Dieselbe Autorin fand, indem sie von einem Gedanken Weinlands ausging, daß in dem so sauer reagierenden Magensaft von *Soyllium* eine organische Säure enthalten sei, beim Destillieren Ameisensäure darin. Alle studierten Selachier ergaben saure Reaktion des Mageninhaltes, mit Ausnahme zweier Exemplare von *Raja*, die alkalische Reaktion zeigten.

M. van Herwerden, die sich auch mit dem Studium des Magensaftes der Teleostier beschäftigte, sah, daß bei einigen dieser Tiere die Reaktion sauer war (unter diesen *Conger* und *Box*, die ich ebenfalls studiert habe), bei anderen alkalisch und endlich bei anderen neutral.

Bei allen von ihr studierten Teleostiern wurden nicht, oder wenn sie es wurden, nur zu einem minimalen Teil die mit Blutserum gefüllten Röhren durch die Extrakte von Magenschleimhaut verdaut. Nach ihr hängt dies von einem Umstande ab, den schon Hammersten bei *Esox*

Lucius konstatiert hat, nämlich von der sauren Reaktion und von der Temperatur des Brutschranks, während das Fibrin<sup>1</sup> in Anwesenheit einer 0,2 %igen HCl-Lösung offenbar verdaut wurde (dies ist kein Widerspruch, denn bekanntlich wird das Fibrin stets viel leichter im Vergleich zum Bluteserum verdaut).

Die Autorin machte auch topographische Untersuchungen über die Verdauung der verschiedenen Teile der Magenschleimhaut von *Scyllium canicula* und sah, daß, während der kardiakale Teil in einer 0,5 %igen HCl-Lösung bei einer Temperatur von 36° in einer Stunde verdaut wurde, ein gleiches Quantum des Pylorusteiles in 5 Stunden nur ein minimales Anzeichen von Verdauung zeigte.

Nun müssen wir uns mit einem anderen Faktor beschäftigen, hinsichtlich dessen noch immer einander sehr widersprechende Angaben gemacht werden; ich meine den Einfluß der Temperatur auf die Pepsinwirkung bei der Verdauung der Fische.

Zuerst Murisier<sup>1)</sup>, dann Hoppe-Seyler<sup>2)</sup> fanden, daß die Temperatur der maximalen Einwirkung des Pepsins im Magenextrakt der Fische zwischen 10 und 15° liegt.

Auch Ch. Richet sagt, das Pepsin der Haifische sei auch bei 20 bis 40° energisch.

Yung dagegen konstatierte bei denselben Fischen, daß die Auflösung des Albumins rascher bei 38° als bei 17° erfolgt. Sellier, der sich eingehend damit beschäftigte, den Einfluß der Temperatur auf die verdauende Wirkung des Pepsins des Magens verschiedener Fische zu untersuchen, gelangte zum Schlusse, daß, je niedriger die Temperatur, desto geringer die Verdauungstätigkeit ist (bei 14° ist die Verdauung langsamer, als man gewöhnlich angenommen hat).

Das Maximum der Wirkung ist bei 50°, das Ferment ist noch bei 60° aktiv; es wird endgültig zerstört gegen 70°, und auch um 0° herum ist es wenig aktiv. Sellier meint ferner, es sei nicht angängig, dem Pepsin der Fische besondere Eigenschaften zuzuschreiben, die es von dem der höheren Tiere unterscheiden lassen. Er führte seine Untersuchungen an reinem Pepsin aus (das er durch ein besonderes Verfahren aus der Schleimhaut der verschiedenen Fische isolierte); es war bei 35° getrocknet, und er ließ es dann auf das Fibrin des Blutes einwirken.

Dann setzte er, wie auch A. Petit es tat, HNO<sub>3</sub> Tropfen nach Tropfen hinzu, eine ziemlich gute Methode, da sie das Ende der Verdauungerscheingung bezeichnet.

Im Verlauf meiner Experimente, die ich machte, um die verdauende Wirkung des Pepsins der verschiedenen Fische zu studieren, brachte ich stets die Röhren, die die betreffenden Lösungen enthielten, und darin die kleinen Röhren mit Bluteserum auf Brutschranktemperatur bei 36°.

---

<sup>1) 2)</sup> Zitiert nach Yung, Arch. de Zoologie experimentelle 1890.

Nr.	Die Agargelatine blieb in Be- rührung mit der Schleimhaut Stunden	Temperatur in Graden Celsius, die die Mett- Fermischen Röhren hatten	Verdauung des Blut- serums der Röhren n. Stunden	Millimeter von geronne- nem Blutserum, verdaut in den kleinen Röhren (Magengegend) mm
-----	--	--	--	---

*Scyllium catulus.*

1	16	36°	4,40	<sup>1</sup> 7-7	<sup>2</sup> 10-10	<sup>3</sup> 3-4
			30,15	10-10	15-15	6-6
1a	24	36°	3,50	9-9	9-11	7-7
			23	10-10	alles verdaut	8-8
5	23,30	36°	6	8-9	12-12	3-5
			25	9-9	alles verdaut	6-7

*Scyllium canicula.*

1	24	36°	2,45	8-10	15-15	4-4
			24	9-9	alles verdaut	5-5
5	23,30	36°	4,10	12-12	12-12	5-6
			25	7-8	8-10	4-5

*Box salpa.*

1	19,25	37°	23,35	alles verd.	18-18,5	17,9-18,5
2	19,25	37°	23,40	15-15	12,5-14	12-14
3	24	37°	48	10-15	15-18	9-10

*Conger vulgaris.*

1	18,40	37°	5,50	0-15	5-15	15-15
2	18,40	37°	5,50	5-16	15-18	alles verdaut

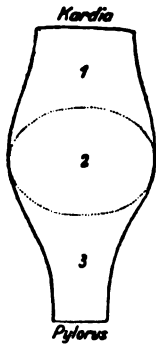


Fig. 1.

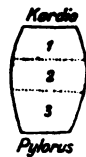


Fig. 2.

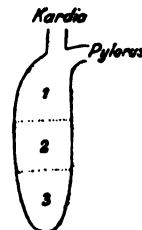


Fig. 3.

Aus diesen, die topographische Verteilung des Pepsins (einschließlich Pepsinogen) betreffenden Experimenten schließe ich,



wie sich auch klar aus den von mir beigegebenen Figuren 1 bis 3 ergibt: Bei *Scyllium* (*catulus* und *canicula*) und bei *Box* (*salpa*) findet sich eine größere Menge dieses Fermentes in der mittleren Gegend des Magens (2), dann in der Gegend der Kardia (1) und endlich in der Pylorusgegend (3) in geringerer Menge. Bei *Conger* (*vulgaris*) dagegen ist eine größere Pepsinmenge in der Gegend 3 lokalisiert, die die Sackgasse des Magens bildet, und nimmt dann stufenweise in der Richtung nach den oberen Gegenden (2—1) hin immer mehr ab.

Biologisch ist diese so charakteristische Verteilung von der größten Wichtigkeit, weil eine größere Menge Pepsin (einschließlich Pepsinogen) sich in den Gegenden des Magens befindet, wo die Nahrungsmittel längere Zeit verweilen müssen (bei *Scyllium catulus* und *canicula* und bei *Box* eben in der mittleren Gegend des Magens, bei *Conger* in dessen unterem Teil). Umgekehrt ist eine geringere Menge in den Gegenden lokalisiert, wo die Speisen sich nur auf ihrem Durchgang befinden und deshalb nicht längere Zeit verweilen.

## II. Chymosin-Prochymosin.

**Labferment.** — Der Extrahierungsprozeß dieses Fermentes aus der Mucosa mit Gelatine-Agar ist gleich dem hinsichtlich des Pepsins angewandten. Nachdem die Würfel aus neutralem Agar wenigstens 8 Stunden in Kontakt mit der Schleimhaut geblieben waren, wurden sie zerrieben; hierauf wurden  $\frac{1}{2}$  ccm 0,4%ige HCl und 10 ccm Milch hinzugesetzt. Jede halbe Minute wurden die Röhren notiert, in denen die Milch geronnen war.

Sullivan<sup>1)</sup> konnte nie Anwesenheit von Labferment der Milch im Magensaft mit neutraler Reaktion der von ihm studierten Selachier konstatieren.

Dagegen traf die erwähnte van Herwerden es konstant bei allen von ihr studierten Selachiern im Extrakt ihrer Magenschleimhaut mit neutraler oder schwach saurer Reaktion.

Hamburger sah bei Anwendung seiner mehrmals erwähnten Methode im Schweinemagen, daß die Verteilung des Chymosins (einschließlich des Prochymosins) dem des Pepsins (mit Einschluß des Propepsins) ähnlich ist. Und in dieser Hinsicht bestätigte er nur die Untersuchungen

---

<sup>1)</sup> U. S. Bureau of Fisheries Bull. 27, 1907.

von Nencki und Sieber<sup>1)</sup>, von Pekkelharing<sup>2)</sup>, Pawlow und Parastschuk<sup>3)</sup> und von Sawjalow<sup>4)</sup>.

Ich führe in Kürze die Resultate meiner Experimente an, die ich bei Untersuchungen über das Labferment im Magen der verschiedenen Fische nach der oben beschriebenen Methode erhalten habe.

Name des Fisches	Nr.	Sichtbare Gerinnung in Minuten in der Gegend		
		1	2	3
Scyllium catulus	1	2—2 $\frac{1}{2}$	1—1 $\frac{1}{2}$	2 $\frac{1}{2}$ —3
" "	6	2	1	3 $\frac{1}{2}$
" "	3	2 $\frac{1}{2}$	1	3
Scyllium canicula	3	2 $\frac{1}{2}$	1 $\frac{1}{2}$	3 $\frac{1}{2}$
Box salpa . . .	1	15	7 $\frac{1}{2}$	20
Conger vulgaris	3	3 $\frac{1}{2}$	2 $\frac{1}{2}$	1

Meine Experimente über das Labferment bei den Fischen bestätigen mithin, was auch andere Autoren bei anderen Tieren gesehen haben, nämlich daß die Topographie des Chymosins vollkommen der des Pepsins entspricht.

### III. Lipolytisches Ferment.

Die gewöhnlichen Röhren mit Gelatine-Agar werden auf die Mucosa gebracht. Nachdem sie wenigstens 48 Stunden mit ihr in Kontakt gewesen sind, werden die Würfel schließlich zerrieben; dann wird mit 10 ccm 2% igen NaFl extrahiert und filtriert. Die quantitative Untersuchung des lipolytischen Fermentes geschah nach der Hanriotschen Methode<sup>5)</sup>, d. h. mit Monobutyryn. In einem Reagensglas wurden 10 ccm einer wässerigen, neutralen, 1% igen Monobutyryn-Lösung mit 5 ccm des Filtrates gemischt.

Das Gemisch wird in den Brutschrank bei 36° gebracht und das Filtrat nach einer bestimmten Zahl von Stunden mit einer  $\frac{1}{10}$ -NaOH-Lösung titriert, indem man als Indicator das Phenolphthalein nimmt, um die Säure, die sich gebildet hat, zu

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 291, 1901.

<sup>2)</sup> Ibidem 35, 8, 1902.

<sup>3)</sup> Ibidem 42, 42, 1904.

<sup>4)</sup> Ibidem 46, 307, 1905.

<sup>5)</sup> Arch. de Physiol. 10, 797, 1898.

erkennen. Man bringt das Reagensglas wieder in den Brutschrank und titriert wieder mit der gewöhnlichen Sodalösung, um die neue Menge Säure, die sich gebildet hat, zu erkennen, und fährt so fort, bis man keine saure Reaktion mehr erhält. Es ist ja nunmehr festgestellt, daß ein solches Ferment im Magen vorhanden ist und nicht aus dem Pankreas in ihn übergeht; Marcet<sup>1)</sup> scheint zuert die Funktion der Magenschleimhaut, die Fette zu spalten, entdeckt zu haben. Unzweifelhaft war es jedoch Volhard<sup>2)</sup>, der diese Frage nach der lipolytischen Funktion des Magensaftes namentlich in klinischer Hinsicht und vermittelt einer ziemlich genauen experimentellen Methode gründlich aufgeklärt hat.

Untersuchungen über das lipolytische Ferment der Fische verdanken wir M. van Herwerden, die dadurch festgestellt hat, daß ein fettspaltendes Ferment im Magen der Selachier sowohl als der Teleostier enthalten ist. Sie verwandte eine Glycerinlösung der Magenschleimhaut, die sie in Kontakt mit der Monobutyrim-Lösung und dann in den Brutschrank bei 38° brachte, worauf sie die gebildete Säure mit einer  $\frac{1}{10}$ -NaOH-Lösung neutralisierte. Bei den Selachiern waren 1,35 ccm von  $\frac{1}{10}$ -NaOH zur Neutralisierung der gebildeten Säure erforderlich, während von dem gekochten Glycerinextrakt 0,1 ccm genügte; an einer anderen Stelle (S. 492) sagt sie jedoch: „immer negativ waren die Resultate mit gekochtem Extrakt“. Bei einem Embryo von *Acanthias* fand sie kein lipolytisches Enzym. Auch bei den Telostiern zeigt sich eine deutliche Reduzierung des Monobutyrim. Was sodann die Topographie dieses lipolytischen Enzyms anbelangt, so war der Kardiateil reicher daran als der Pylorusteil. Auch im Magen der höheren Vertebraten zeigen sich, wie es scheint, dieselben Erscheinungen, da Benech und Guyot<sup>3)</sup> im Pferdemagen sahen, daß der Kardiateil doppelt so viel Monobutyrim als eine gleiche Fläche des Pylorusteiles spaltete. M. van Herwerden konnte nie „eine lipolytische Wirkung in Extrakten der Darmmuskulatur konstatieren“ (S. 492).

Was ferner den Einfluß der Säuren und Alkalien auf dieses Ferment betrifft, so wird ihre Wirkung bei gleicher Konzentration der beiden mehr durch die Alkalien als durch die Säuren gehindert. Daraus schließt sie, daß, wenigstens bei den Selachiern, die Lipolyse auf dem Höhepunkt der peptischen Verdauung fehlt oder minimal ist.

---

<sup>1)</sup> The med. Time and Gazette. New Series 18, 1858.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. klin. Med. 42, 414, 1901.

<sup>3)</sup> Compt. rend. Soc. Biol. 55, 994, 1903.

Name des Fisches	Nr.	Gegend	Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ -NaOH, um die 10 ccm Monobutyrin-Lösung enthaltende Flüssigkeit (Indicator Phenolphthalein) zu neutralisieren nach Stunden			
			2	6	11	24
Scyllium catulus	8	3	0,4	0,8	0,8	1,35
		2	0,6	0,9	1,1	2,1
		1	0,9	1,2	1,8	2,7
" "	2	3	0,6	0,7	0,8	1,25
		2	0,7	0,9	1,0	2,0
		1	0,6	1,0	1,5	2,5
Scyllium canicula	2	3	0,3	0,7	0,9	1,25
		2	0,5	0,8	1,0	2,0
		1	0,9	1,0	1,5	2,4
" "	8	3	0,4	0,8	0,9	1,3
		2	0,6	0,9	1,1	2,0
		1	0,9	1,1	1,6	2,5
Conger vulgaris	5	1	0,3	0,35	0,9	0,9
		2	0,35	0,55	0,5	0,7
		3	0,3	0,4	0,9	1,6
Box salpa	1	1	0,5	0,7	1,1	1,3
		2	0,2	0,5	0,9	1,0
		3	0,3	0,4	0,7	0,8
" "	2	1	0,6	0,9	1,4	1,5
		2	0,2	0,5	0,8	0,9
		3	0,2	0,4	0,6	0,8

Aus meinen Experimenten lassen sich verschiedene Schlüsse in bezug auf das lipolytische Ferment ziehen, je nach den Fischen, die zum Experiment dienen. Bei den Selachiern (*Scyllium catulus* und *canicula*) wie auch bei *Box salpa* nimmt die Wirkung des lipolytischen Fermentes allmählich ab, wenn man von der Kardiagegend zur Pylorusgegend fortschreitet. In dieser Hinsicht werden die Resultate bestätigt, die van Herwerden erhielt, als sie dieses Enzym sowohl bei den Selachiern als bei den Teleostiern aufsuchte.

Beim *Conger* dagegen, bei welchem die Einrichtung des Magens von der der vorhin erwähnten Fische verschieden ist, da er einen wahren und eigentlichen *cul de sac* bildet, nimmt die Menge des Fermentes in dem Maße zu, wie man zum Hintergrund des Magens fortschreitet.

#### IV. Amylytisches Ferment.

Um zu untersuchen, ob amylytisches Ferment in der Magenschleimhaut vorhanden ist, bedeckt man letztere mit Röhren

mit einfachem Gelatine-Agar, nachdem man sie sorgfältig mit Meerwasser abgewaschen hat, um den ganzen Schleim zu entfernen. Die Gelatine läßt man wenigstens 48 Stunden in Berührung mit der Schleimhaut, dann werden die Würfel tüchtig zerrieben, mit einer 2%igen NaFl-Lösung extrahiert und filtriert; im Filtrat sucht man dann das amylolytische Ferment auf. Ich verwendete zu seiner Aufsuchung das Dolinski-Walthersche Verfahren. Man nimmt kleine Glasröhren von einem Innendurchmesser von 1,5 mm. Nachdem sie sorgfältig mit  $H_2SO_4$ ,  $H_2O$ , Alkohol und Äther gewaschen und dann getrocknet worden sind, füllt man sie mittels Aspiration mit einer Lösung von methylviolett gefärbtem Kartoffelmehl, das man erhält, indem man im Wasserbad 2 g Kartoffelmehl in 20 ccm  $H_2O$  unter Zusatz von 3 ccm einer konzentrierten Methylviolett-Lösung kocht. Das Experiment wird bei gewöhnlicher Temperatur gemacht, und man taucht die Röhren nur mit einem Ende ein. 20 Tropfen des Saftes, der untersucht werden soll, werden mit dem die Stärke enthaltenden Glasröhrchen in Berührung gebracht, und man merkt sich die Länge der nach 30 Minuten bzw. 1 bis 3 bis 5 Stunden verdauten Stärke. Dasselbe Experiment wird auch gemacht, indem man den gekochten Extrakt verwendet.

M. van Herwerden hat gesehen, daß ein diastatisches Enzym im sauren Extrakt der Magenschleimhaut von *Scyllium* absolut fehlt. Sie brachte Stärke in Meerwasser und führte es dann mit einer Sonde in den Magen ein; als es nach einigen Stunden mit einer Sonde herausgezogen wurde, fand sie in diesem Saft nie einen reduzierenden Zucker. Auch in Meerwasser in den Magen eingeführtes Glykogen ergab nie eine Reduktion mit der Fehlingschen Flüssigkeit. Richet und Yung erhielten ebenfalls vorher negative Resultate hinsichtlich der Wirkung des Magensaftes von Selachiern auf die Stärke. Auch Weinland führte diesbezügliche Untersuchungen an verschiedenen Selachiern aus. Er fand ein diastatisches Enzym im alkalischen Magensaft von *Raja*, wie auch im Extrakt der *Mucosa*, die alkoholische Reaktion zeigte, außerdem in Extrakten der *Mucosa* der hungernden *Raja* (weil auf diese Weise die mögliche Anwesenheit des diastatischen Enzyms aus der Nahrung der Krustaceen entfernt zu sein scheint). In dieser Hinsicht fand die erwähnte van Herwerden nie ein derartiges Ferment bei solchen Tieren, die eine saure Reaktion des Magensaftes zeigten. Nur in einem Magen von *Mustelus vulgaris* konnte sie während der Verdauung der Krustaceen ein amylolytisches Ferment finden; es ist jedoch zweifelhaft, ob es aus den Nahrungsmitteln stammte.

Was die von mir erhaltenen Resultate anbelangt, so habe ich mit den von mir angewendeten Methoden nie das Vorhandensein eines amylytischen Fermentes weder bei den Selachiern noch bei den Teleostiern, die zu meinen Untersuchungen dienten, konstatiert.

#### V. Invertase.

Zur Aufsuchung dieses Fermentes und zur Extrahierung der Mucosa wendet man ebenfalls das gleiche Verfahren an wie beim amylytischen Ferment. Das Filtrat läßt man auf eine Lösung von Rohrzucker in Anwesenheit von Toluol bei einer Temperatur von 30° einwirken. Nach Ausscheidung der Eiweißstoffe durch Fällung mit Salpetersäure filtriert man und sucht im Filtrat den Zucker auf vermittelt der Reaktionen von Trommer und von Böttger.

Nun ergaben diese Reaktionen aber stets ein negatives Resultat, was uns beweist, daß in der Magenschleimhaut, wenigstens der von mir untersuchten Fische, kein Invertferment vorhanden ist.

#### Fermente des Darmrohrs.

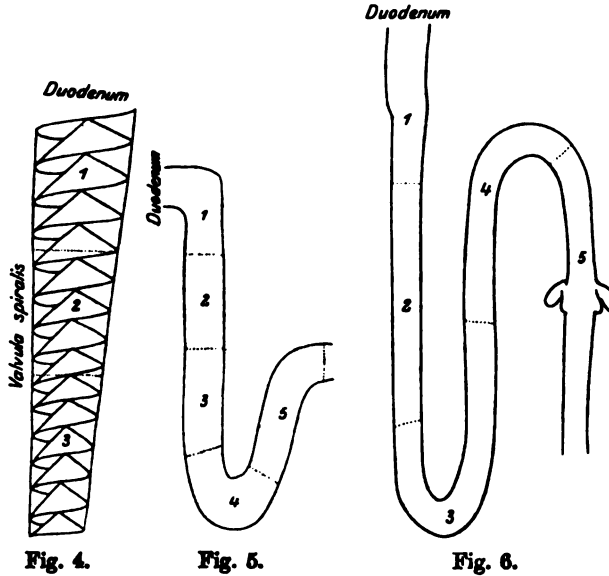
##### I. Enterokinase.

Man bedeckt die Schleimhaut des Darmrohrs mit Röhrcchen mit einfachem Agar und läßt sie 24 Stunden lang in Berührung mit denselben; dann werden sie zerrieben und mit 3 ccm 2%igen NaFl extrahiert, hierauf wird filtriert. Dann werden zu 2 ccm Filtrat 5 ccm verdünnter Pankreassaft hinzugesetzt (diesen Saft erhält man, indem man das Pankreas eines Selachiers, wie Scyllium, Torpedo, oder das Leber-Pankreas eines Teleostiers, wie Conger, Box, mit einer 2%igen NaFl-Lösung filtriert; diese Auspressung wird dann filtriert). Man legt (wie bei der Aufsuchung des proteolytischen Fermentes) zwei Capillarröhren mit durch Methylviolett gefärbter 25%iger Gelatine und bringt sie dann in den Brutschrank bei 30°; man sieht dann, welche Menge Gelatine in den Röhren in einem Zeitabschnitt von 3 resp. 8, 20, 24, 36 Stunden verdaut wird.

Um gleichzeitig auch einen Kontrollversuch zu machen, bringt man 2 ccm Agarfiltrat in 6 ccm einer 2%igen NaFl-Lösung statt in Pankreasflüssigkeit; die Gelatine der beiden

hineingebrachten Röhrechen wird in einem Zeitraum von 19 bis 44 Stunden verdaut.

Bei verschiedenen Wirbeltieren sahen Chepowalnikow<sup>1)</sup>, Delesenne<sup>2)</sup>, Frouin<sup>3)</sup> und Falloise<sup>4)</sup>, Hamburger, daß die Enterokinase in deren Darmrohr allmählich von oben nach unten stufenweise abnimmt.



Name des Fisches	Nr.	Menge der nach 48 Stunden verdauten Gelatine in mm Gegend des Darmrohrs				
		1	2	2-3	3	4-5
Soyllium catulus	1	8,3	7,1	—	4,2	—
	3	9,5	7,1	—	5,1	—
	5	9,5	6,9	—	5,8	—
	7	8,5	6,8	—	5,4	—
Soyllium canicula	9	9,8	7,5	—	6,4	—
	1	11,4	6,2	—	5,2	—
	5	8,5	6,4	—	4,8	—
Conger vulgaris	7	7,6	5,8	—	4,5	—
	9	14,4	10,6	—	8,4	—
	1	6,0	—	5,0	—	3,0
Box salpa	2	9,0	—	6,0	—	4,5
	3	8,9	—	7,5	—	5,4
	4	15,0	—	12,0	—	9,5
	1	10,0	8,0	—	6,0	5,0
"	2	9,5	7,4	—	6,3	4,8
	3	8,7	7,0	—	5,8	4,5

1) 2) 3) 4) Zitiert nach Hamburger, loc. cit. S. 438.

Mithin zeigt sich, wie sich klar aus meiner Tabelle und aus den von mir beigegebenen schematischen Figuren 4 bis 6 ergibt, was man bei den anderen Vertebraten beobachtet, nämlich, daß die Enterokinase im Darmrohr allmählich von oben nach unten, von der Gegend des Duodenums zu der des Anus abnimmt.

## II. Erepsin<sup>1)</sup>.

Man läßt die Röhrcchen mit Gelatine-Agar 48 Stunden lang in Kontakt mit der Mucosa des Magen-Darmrohrs. Nach Verlauf dieser Zeit werden die Würfel titriert und mit einer 2<sup>o</sup>/<sub>o</sub>igen NaFl-Lösung im Quantum von 10 ccm gemischt.

Wie bekannt, besteht die Wirkung des Erepsins in dem Vermögen, die Blutalbumosen und Peptone in Produkte umzuwandeln, die die Biuretreaktion nicht geben. Vernon<sup>2)</sup> hat auf diese Eigenschaft eine colorimetrische Methode gegründet, um den Grad der vom Erepsin hervorgerufenen Umwandlung zu bestimmen, und Falloise<sup>3)</sup> hat dann die Methode mit Erfolg angewendet.

In kleine Gefäße von einer Kapazität von 10 ccm werden 9 ccm einer 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub><sup>o</sup>/<sub>o</sub>igen filtrierten Peptonlösung und 1 ccm des

<sup>1)</sup> An dieser Stelle möchte ich daran erinnern, daß nicht O. Cohnheim es gewesen ist, wie man oft glaubt und wie alle deutschen Lehrbücher der Physiologie und der physiologischen Chemie berichten, der zuerst entdeckt hat, daß die Umwandlung der Peptone im Darmrohr durch ein Enzym geschieht, sondern der italienische Professor der Physiologie A. Capparelli in Catania. Capparelli veröffentlichte im Januar 1899 eine Abhandlung: *Sulla trasformazione dei Peptoni nell'intestino*, *Atti della Accademia Gioenia di Scienze naturali in Catania* Vol. XII, Serie 7<sup>a</sup> 1899, Memoria VII Estratto, p. 1 bis 15, in der er sich sehr klar in der Zusammenfassung am Schluß seiner Arbeit (S. 14 bis 15) dahin ausspricht, daß das Endprodukt der Verdauung der Eiweißsubstanzen im Darmrohr nicht das Pepton ist, und daß die Umwandlung der Peptone in diesen neuen Körper durch ein Enzym geschieht. Erst 3 Jahre später, im Jahre 1901, veröffentlichte O. Cohnheim seine diesbezügliche Abhandlung (O. Cohnheim, Die Umwandlung des Eiweißes durch die Darmwand, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 33, 451 bis 465, 1901), ohne darin die Arbeiten Capparellis überhaupt zu erwähnen, und ihm ist allein das Verdienst zuzusprechen, den Namen „Erepsin“ (S. 460) jenem Ferment gegeben zu haben. Ganz unzweifelhaft hat aber A. Capparelli zuerst nachgewiesen, daß die Umwandlung des Peptons im Darmrohr durch ein Enzym stattfindet, und sicher ist, daß O. Cohnheim lange Zeit nachher diese Untersuchungen bestätigt und diesem speziellen Enzym den Namen (Erepsin) gegeben hat.

<sup>2)</sup> *Journ. of Physiol.* 30, 30, 1903.

<sup>3)</sup> *Arch. intern. de physiol.* 2, 299, 1903/04.



intestinalen Agarfiltrats eingeführt. Man setzt 10 Tropfen Toluol hinzu, schüttelt gehörig und bringt es in den Brutschrank bei 30°, indem man die Röhren luftdicht verschließt. In eine Kontrollröhre bringt man ein Quantum des gekochten intestinalen Agarfiltrates. Es verbleibt vier Tage im Brutofen. Dann wendet man die Vernonsche colorimetrische Methode an: eine  $\text{CuSO}_4$ -Lösung wird mit einer  $\text{NaOH}$ -Lösung behandelt; dieser Flüssigkeit setzt man eine Lösung von filtriertem und  $2\frac{1}{2}\%$ igem titrierten Pepton hinzu und bewahrt diese als Probenflüssigkeit auf, die sofort eine rot-veilchenblaue Färbung annimmt.

Demselben Quantum der Lösung von  $\text{CuSO}_4$  und  $\text{NaOH}$  setzt man auch dieselbe Menge der Flüssigkeit zu, in der man das Erepsin aufsuchen will und die im Brutschrank aufbewahrt wurde. Je mehr die Lösung des verwendeten Peptons sich mit dem Erepsin umwandelt, desto schwächer ist die charakteristische rot-veilchenblaue Färbung. Man berücksichtigt die Wassermenge, die erforderlich ist, um die Probenflüssigkeit zu verdünnen, bis sie die mit dem Erepsin erhaltene veilchenblaue Färbung ergibt; dann bestimmt man den Prozentgehalt. Um eine peinliche Genauigkeit der quantitativen Bestimmung zu erhalten, empfehle ich das Colorimeter oder besser noch das Spektrophotometer nach den bestimmten Absorptionsstreifen zu verwenden. Die Gelatine-Agarwürfel wurden in die verschiedenen Gegenden des Darmrohrs gebracht, und zwar bei den Selachiern und beim Conger, die ein verhältnismäßig kurzes Darmrohr haben, drei, während auf die Mucoosa des Darmrohrs von *Box salpa* vier gebracht wurden. Da letzterer als Pflanzenfresser ein viel längeres Darmrohr als die anderen hat, konnte dieses mit einer größeren Zahl von Gelatine-Agarwürfeln bedeckt werden.

Hamburger fand im Darmrohr des Hundes mit seiner Methode eine größere Menge Erepsin im Ileum als im Duodenum; Falloise beobachtete ebenfalls denselben Unterschied im Darmrohr des Schweines, aber er war durchaus minimal, was sich vielleicht durch die verwendeten zwei Tierarten erklärt.

Hamburger hatte Gelegenheit zu beobachten, daß eine größere Menge Erepsin beim Hungern und im Ileum als im Duodenum vorhanden ist.

Diese Resultate stimmen mit denen von Falloise überein, der fand, daß beim Darmrohr des Hundes im Ileum eine größere Menge Erepsin vorhanden ist als im Duodenum.

Name des Fisches	Nr.	Prozentmenge der Probe-Peptonlösung Gegend des Darmrohrs				
		1	2	3	4	5
<i>Scyllium ocatulus</i>	6	65	45	35	—	—
" "	8	50	45	35	—	—
<i>Scyllium canicula</i>	6	80	60	35	—	—
" "	8	70	60	50	—	—
<i>Conger vulgaris</i>	5	60	55	50	42	35
" "	3	75	—	70	—	40
<i>Box salpa</i>	1	55	—	30	25	20
" "	2	—	30	—	20	—
" "	3	55	—	30	—	20

Aus diesen Experimenten schließe ich, daß bei den Fischen die Erepsinmenge vom Duodenum nach der Gegend des Rectums hin immer mehr zunimmt.

# Über den Energieverbrauch bei der Geharbeit unter dem Einfluß verschiedener Geschwindigkeiten und verschiedener Belastungen.

Von  
Ernst Brezina und Walther Kolmer.

(Aus dem physiologischen Institut der Hochschule für Bodenkultur  
in Wien.)

(Eingegangen am 27. November 1911.)

Mit 9 Figuren im Text.

Die ersten eingehenden Versuche über den Energieverbrauch des Menschen und der Tiere bei der Geharbeit rühren von Zuntz und seiner Schule her.

Mit Hilfe der durch Zuntz ausgebildeten Methodik der Gaswechseluntersuchung ist es möglich, ein genaues Bild von der Größe der Ventilation unter den verschiedensten Versuchsbedingungen zu gewinnen, und hierbei gestattet die Versuchsanordnung entsprechende Durchschnittsproben von den Atemgasen zu erhalten und der exakten Analyse zuzuführen. Auf Grund so gewonnener Werte gelingt es, den einer bestimmten geleisteten Arbeit entsprechenden Sauerstoffverbrauch, bzw. die entsprechende CO<sub>2</sub>-Produktion festzustellen. So hat zuerst Katzenstein<sup>1)</sup> unter der Leitung von Zuntz neben Untersuchungen über die Dreharbeit auch solche über den Horizontalmarsch und den Marsch auf ansteigender Bahn ausgeführt. Um bei diesen Versuchen darüber Aufschluß zu gewinnen, wieviel Sauerstoff für die geleistete Steigarbeit allein verbraucht worden war, wurde vom Gesamt-O-Verbrauch ein konstanter Wert abgezogen, der in den Versuchen über den Horizontalmarsch gefunden worden war. Dabei wurde vorausgesetzt, daß dieser Wert der Arbeitsleistung für die Fortbewegung der Körperlast in der Horizontalrichtung entspreche. Er wurde als „Horizontalkomponente“ bezeichnet.

In Versuchen mit Lehmann und Hagemann zeigte Zuntz<sup>2)</sup> dann weiter, daß man aus den Zahlen für den Sauerstoffverbrauch unter Berücksichtigung des jeweiligen respiratorischen Quotienten direkt den Energieverbrauch in Calorien ermitteln könne. Berechnet man auf Grund dieses Verfahrens die Versuche von Katzenstein, so ergibt sich aus dem beobachteten O-Verbrauch ein Energieaufwand von 0,558 cal. für das m und kg als „Horizontalkomponente“.

<sup>1)</sup> Katzenstein, Über die Einwirkung der Muskeltätigkeit auf den Stoffverbrauch des Menschen. Arch. f. d. ges. Physiol. 49, 330 1891.

<sup>2)</sup> Zuntz, Lehmann und Hagemann, Untersuchungen über den Stoffwechsel des Pferdes bei Ruhe und Arbeit. Berlin 1898.

In ihren ausführlichen Untersuchungen über die Physiologie des Marsches haben dann Zuntz und Schumburg<sup>1)</sup> zahlreiche weitere Versuche an verschiedenen Personen über den Energieverbrauch beim Horizontalmarsch angestellt. Aus den dabei gewonnenen Resultaten erkannten sie, daß der Energieverbrauch einerseits von der Marschgeschwindigkeit, andererseits von der Belastung, sowie von anderen Faktoren (Ermüdung usw.) abhängig sei. Als Mittel für den Energieaufwand bei der Fortbewegung eines Kilogramms längs eines Meter Weges ergab sich ein Wert von 0,518 cal., der demnach ihre Horizontalkomponente darstellt.

Wie wir einer kritischen Besprechung von Durig<sup>2)</sup> über diesen Gegenstand entnehmen, haben mehrere in ähnlicher Weise ausgeführte Versuchsreihen (sie wurden größtenteils auf der Treibahn absolviert) zu ähnlichen Zahlen geführt. So wurden bei A. und I. Löwy 0,53, L. Zuntz 0,57<sup>3)</sup>, L. Zuntz 0,552<sup>4)</sup>, Frentzel 0,512, Reach 0,538<sup>5)</sup> cal. gefunden.

Während diese Resultate miteinander so ziemlich übereinstimmen, weichen von ihnen die Zahlen, die Zuntz und seine Mitarbeiter<sup>6)</sup> im Jahre 1901 in den Untersuchungen über das Höhenklima ermittelten und die auch in Versuchen auf der Treibahn gewonnen wurden, nicht unwesentlich ab.

Auch jene Werte, die Sondén und Tigerstedt<sup>7)</sup> mit Hilfe einer ganz verschiedenen Methodik (im Respirationsapparat) feststellten, liegen wesentlich niedriger. Wie Durig ausgeführt hat, ist der große Unterschied der Zahlen nur ein scheinbarer, und die Differenzen lassen sich dadurch erklären, daß die Versuchsbedingungen nicht einheitliche waren. Berücksichtigt man diese Umstände, so kommt man durch eine geeignete Umrechnung der Werte wieder zu einem Mittelwert von etwa 0,55 cal. pro kg und m Horizontalmarsch (l. c. S. 253 bis 260). Immerhin muß man aber bedenken, daß sich alle hier angeführten Versuchsergebnisse nur mit Vorbehalt untereinander vergleichen lassen. Die älteren Versuche wurden nur zum geringsten Teil an Personen in nüchternem Zustande ausgeführt, teilweise sogar auch auf einer Treibahn, die nicht vollkommen horizontal war, teilweise auf ebenem Boden ganz verschiedener Beschaffenheit. Dagegen sind die neueren Versuche von Durig und seinen Mitarbeitern in nüchternem Zustande und auf vollkommen ebenem Wege und mit etwas verbesserter Versuchs- und Analysetechnik ausgeführt worden. Auch der zur Bestimmung des Ver-

<sup>1)</sup> Zuntz und Schumburg, Studien zu einer Physiologie des Marsches. Berlin 1901 und Arch. f. d. ges. Physiol. 63, 482; 68, 208.

<sup>2)</sup> Durig (Kolmer, Rainer, Reichel, Caspari), Über den Gaswechsel beim Gehen. Denkschr. d. math.-nat. Klasse d. Akad. d. Wiss. Wien 86, 242.

<sup>3)</sup> A. Loewy, I. Loewy und L. Zuntz, Arch. f. d. ges. Physiol. 66, 477.

<sup>4)</sup> L. Zuntz, Untersuchungen über den Gaswechsel des Radfahrers. Berlin 1899, Hirschwald.

<sup>5)</sup> Frentzel und Reach, Arch. f. d. ges. Physiol. 83, 483.

<sup>6)</sup> Zuntz, Loewy, Müller, Caspari, Höhenklima und Bergwanderungen. Berlin 1903, Bong.

<sup>7)</sup> Sondén und Tigerstedt, Scand. Arch. 6, 1, 1895.

brauchs bei der Arbeit als Ruheverbrauch abgezogene Wert ist nicht in allen Fällen derselbe. So wurde in den Versuchen von Katzenstein z. B. der Ruhewert beim Stehen in Abzug gebracht, während bei den neueren Untersuchungen ausschließlich die Werte bei vollkommener vor-sätzlicher Körperruhe in Betracht kamen. Gewiß ist es, wie schon Durig ausgeführt hat, fraglich, ob man eigentlich berechtigt ist, den Wert, der bei voller Ruhe im Liegen gewonnen ist (den „Erhaltungsumsatz“), bei Berechnung der Marscharbeit vom Gesamtumsatz zu subtrahieren. Da erfahrungsgemäß nur der Erhaltungsumsatz sich mit genügender Gleich-mäßigkeit bestimmen läßt, der Ruhewert beim Stehen aber recht variabel ist, dürfte praktisch ein anderes Verfahren nicht durchführbar sein. Es ist ferner in Rechnung zu ziehen, daß bei den Versuchen auf der Tret-bahn manche Versuchspersonen selbst die Gasuhr trugen, andere wieder ohne die ca. 11 kg wiegende Gasuhr marschierten. Beim Marsch auf freier Bahn dagegen trugen alle Versuchspersonen die Gasuhr. Aus diesem Grunde war es bei der Berechnung der Horizontalkomponente nicht immer möglich, den Aufwand für die Beförderung der lebenden und der toten Last rein zu trennen.

Über die Beeinflussung, die der Energieaufwand der tierischen Maschine bei Beförderung einer toten Last erfährt, liegen die klassischen Untersuchungen von Zuntz und Hagemann vor, die am Pferde aus-geführt sind. Dabei wurde aus einer größeren Reihe von Einzelversuchen der Energieaufwand pro kg bewegter Masse und ein m Weg (das Tier trug dabei nur die Trachealkanüle und die Ventile), also praktisch ge-nommen der Energieaufwand beim unbelasteten Tier, bei einer Minuten-geschwindigkeit von etwa 90 m mit 0,39 Cal. berechnet.

Bei zunehmender Geschwindigkeit sowohl als auch bei zunehmender Belastung fand eine Steigerung des Umsatzes statt, die sich im Sauer-stoffverbrauch ausdrückte. Bei Belastungen, die etwa 28% des Körper-gewichts ausmachten (höhere Belastungen wurden am Pferd nicht ver-sucht), war gegenüber dem Umsatze im Gehen ohne Last eine geringe Steigerung des Calorienverbrauchs pro m und kg zu konstatieren, indem der Gesamtenergieverbrauch 0,395 Cal. betrug. Es zeigt sich demnach, daß das Pferd im Schritt wesentlich ökonomischer geht als der Mensch.

Auch vom Menschen liegen einige Versuche von Zuntz und Schum-burg vor, die den Einfluß der Belastung auf den Energieverbrauch beim Gehen betreffen. Aus den schon oben angeführten Gründen lassen sie sich nicht ohne weiteres mit neueren Versuchen vergleichen, die Durig und seine Schüler im Anschluß an die Untersuchungen über die Wir-kungen des Höhenklimas ausführten. Bei diesen Versuchen ergab sich für den Horizontalmarsch mit etwa 11 kg Belastung unter Einhaltung mittlerer Geschwindigkeit ein Energieaufwand von 0,553 cal. pro kg be-wegter Gesamtmasse. Die extremen Werte schwanken bei Durig von 0,517 bis 0,559, bei Kolmer von 0,535 bis 0,591, bei Rainer von 0,533 bis 0,584, bei Reichel von 0,514 bis 0,570.

Aber auch die Marschgeschwindigkeit ist von Einfluß auf den Energieverbrauch und somit auf die Horizontalkomponente, was schon

aus den Versuchen von Zuntz und Schumburg sowie aus denen von L. Zuntz und von Frentzel und Reach hervorgeht. Aus der gründlichen Arbeit von L. Zuntz geht hervor, daß bei einer Geschwindigkeit von etwa 60 m in der Minute der Verbrauch in cal. pro m und kg 0,554, bei einer Geschwindigkeit von etwa 100 m 0,653, bei einer solchen von 140 m 1,072 im Mittel betrug. Es zeigte sich also, daß bei Zunahme der Geschwindigkeit der Verbrauch ganz unverhältnismäßig zunahm. Frentzel und Reach haben diese Frage nur nebenbei berücksichtigt.

In der schon angeführten Untersuchungsreihe haben Durig und seine Mitarbeiter auch den Einfluß der Geschwindigkeit auf den Energieverbrauch beim Marsch in systematischer Weise untersucht. Es ergab sich, daß bei mittlerer Geschwindigkeit der Umsatz pro m und kg Horizontalbewegung innerhalb ziemlich enger Grenzen schwankt. Erst oberhalb einer gewissen Grenzgeschwindigkeit, deren Wert individuell verschieden ist, nimmt die für die Arbeitseinheit verbrauchte Energie zu, und zwar um so rascher, je größer die Geschwindigkeit ist. Die genannten Autoren bezeichnen daher den ebenerwähnten Grenzwert als die ökonomische Maximalgeschwindigkeit.

Aus der graphischen Darstellung der Versuchszahlen läßt sich ableiten, daß der Verlauf der Kurve etwa der des Fechner'schen Gesetzes entspricht. Diese Kurve hätte demnach die Gleichung

$$\frac{\text{Umsatz}}{0,55} = e^{k(\text{Geschwindigkeit-Omg})},$$

wobei unter Omg die ökonomische Maximalgeschwindigkeit zu verstehen ist. (Alle letztgenannten Versuche waren an mit der Gasuhr belasteten Personen ausgeführt.)

Caspari<sup>1)</sup> endlich hat an maximaltrainierten Dauergängern Versuche ausgeführt, wobei speziell hohe Geschwindigkeiten berücksichtigt wurden. Auch hier ergab sich bei den hohen Geschwindigkeiten ein weiterer Zuwachs des Energieverbrauches, doch ermöglichen die Werte nicht für verschieden hohe Geschwindigkeiten eine Gesetzmäßigkeit festzulegen.

Es folgt aus dem Vorstehenden, daß die Frage über den Energieaufwand beim Horizontalmarsch noch in mancher Hinsicht einer Beantwortung bedarf. Speziell kann sich aus dem Studium des Einflusses verschiedener Belastung und Geschwindigkeit auf den Umsatz beim Horizontal- und Steigungsmarsch die Möglichkeit ergeben zu bestimmen, was bei der Berechnung der reinen Steigarbeit als Horizontal-komponente für den Menschen angesehen werden muß.

Aus neuester Zeit liegt über den gleichen Gegenstand eine Arbeit von Amar<sup>2)</sup> vor. Dieselbe betrifft den Sauerstoffverbrauch bei verschiedenen Individuen beim Sitzen, Stehen, Gehen an Ort und Stelle und beim Marsch mit verschiedener Geschwindigkeit, teils unbelastet, teils mit geringer (7,3 kg) Belastung. Amar findet einen gewissen, nach

<sup>1)</sup> Physiol. Studien über den Vegetarismus. Arch. f. d. ges. Physiol. 109, 473.

<sup>2)</sup> Amar, Journ. de Physiol. 13, 212, 1911.

der Versuchsperson verschiedenen Mehrverbrauch von Sauerstoff beim Stehen gegenüber dem Sitzen; beim Marsch an Ort und Stelle wächst der Mehrverbrauch proportional der Schrittzahl, beim Gehen im Zimmer zeigt sich der geringste Mehrverbrauch gegenüber dem Sitzen (ökonomisches Gehen) in unbelastetem Zustande, wenn pro Minute 130 Schritte von 0,517 m Länge, pro Stunde also 4,035 km zurückgelegt wurden. Der Mehrverbrauch war sowohl bei langsamem als bei raschem Gehen größer. Beim Gehen mit 7,3 kg Belastung betrug das Optimum der Schrittzahl 85 Schritte von 0,458 m Länge, entsprechend 2,34 km/st.

Die Resultate dieser Untersuchung lassen sich weder mit den von Zuntz und Schumburg noch mit den von Durig ermittelten Werten, noch mit den Ergebnissen der nachstehenden Untersuchung vergleichen. Vor allem fehlen viele wichtige Angaben über die Versuchs- und Analysetechnik. Was darüber angegeben ist, zeigt, daß sie kaum zweckmäßig gewesen sein kann. So wurden die Marschversuche, auf die es uns besonders ankommt, in einem bloß 11 m langen Raum mit fortwährendem Umkehren angestellt, wobei die Gasuhr auf einem Tisch der Versuchsperson nachgeschoben wurde. Kohlensäurebestimmungen der Ausatemungsluft wurden überhaupt nicht gemacht. Auch scheinen Barometerstand und Temperatur unberücksichtigt geblieben zu sein. Es muß daher davon Abstand genommen werden, die von Amar angegebenen Werte auf die von uns berechneten Größen umzurechnen, da die Verlässlichkeit seiner Angaben, wie aus der von Zuntz und Durig eingehend gegebenen Kritik der Gaswechselforschungsmethodik hervorgeht, wohl stark angezweifelt werden darf.

Die im folgenden mitgeteilten Versuche schließen sich im wesentlichen an die Beobachtungen von Durig und seinen Mitarbeitern an. Es sollte speziell in einer großen Anzahl von Versuchen systematisch der Einfluß wachsender Geschwindigkeit auf den Energieverbrauch studiert werden, und dabei insbesondere der Einfluß extrem langsamer und möglichst schneller Gangarten untersucht werden. Andererseits sollte auch die Einwirkung verschiedener Belastungen erforscht werden, wobei die schon von Zuntz und Schumburg erörterte Frage näher zu beleuchten war, in welchem Verhältnis der Aufwand für lebende und tote geförderte Last zueinander stehen.

Versuchsreihen sollten die Gelegenheit geben, gleiche Arbeitsleistungen in der Zeiteinheit, einmal als Produkt großer Geschwindigkeit bei kleiner Belastung, ein andermal größerer Belastung bei geringerer Geschwindigkeit, in ihrem Einfluß auf den Energieverbrauch zu vergleichen.

Es mußte sich dabei entscheiden, ob für den Zuwachs an Geschwindigkeit, wie Zuntz und Schumburg es angenommen

hatten, etwa in arithmetischer Progression ein Zuwachs des Energieverbrauches sich einstellt, oder ob, wie Durig und seine Mitarbeiter gefunden hatten, der Zuwachs der für die Geharbeit aufgewendeten Energie sich in einer Exponentialkurve ausdrückt. Auch mußte sich dabei zeigen, ob analog dem in den Versuchen von Durig und seinen Mitarbeitern aufgestellten Begriff einer für jede Versuchsperson individuellen ökonomischen Maximalgeschwindigkeit sich auch eine ökonomische Maximalbelastung und Maximalleistung ermitteln lasse.

Diese Feststellung besitzt auch einen gewissen praktischen Wert für die Frage, wie Arbeiten, die durch menschliche und tierische Maschinen ausgeführt werden müssen, in bezug auf Form der Arbeitsleistung rationell in Angriff genommen werden können, wie solches etwa bei Soldaten vorkommt. Da die Geharbeit nur einen speziellen Fall der Arbeitsleistung der menschlichen Maschine überhaupt darstellt, so ist zu vermuten, daß die festgestellten Verhältnisse auch für andere Arbeitsleistungen Geltung hätten, für die ähnliche Versuche sich allerdings nur mit wesentlich größeren technischen Schwierigkeiten rationell durchführen lassen werden. Den Vergleich mit anderen in ähnlicher Weise ausgeführten Untersuchungen, wie die von Reach<sup>1)</sup> über die Dreharbeit von Johansson und Kovaen<sup>2)</sup> behalten wir uns für eine spätere Veröffentlichung vor.

#### Ausführung der Versuche.

##### a) Versuche ohne Belastung.

Die Versuchsperson Brezina (in leichter Sommerkleidung) trug in der üblichen Weise die Ventile mit Hilfe von Sicherheitsnadeln und Bändern an der Schulter befestigt. Zur Verwendung gelangten Ventile mit flaschenförmiger Erweiterung des Außenrohres und feinsten Fischblasen-Präservativmembranen, die vollkommen ohne Widerstand arbeiteten. Vor Beginn jedes Versuches wurden die Ventile auf Dichtheit geprüft. Vom Respirationsventil führte ein  $2\frac{1}{2}$  cm weiter, etwa 2 m langer Schlauch über die Schulter der Versuchsperson hinüber zur Gasuhr, die von einer

<sup>1)</sup> Reach, Untersuchungen über die Arbeitsleistung des Menschen mit besonderer Rücksichtnahme auf ihre praktische Beziehung zum Betrieb landwirtschaftlicher Maschinen. Landwirtsch. Jahrb. 1908, 1053.

<sup>2)</sup> Johansson und Kovaen, Skand. Arch. f. Physiol. 1902.



Hilfsperson getragen wurde, die der Versuchsperson in gleichmäßigem Abstand von etwa 2 m folgen mußte, was den Gang der Versuchsperson absolut nicht hinderte.

b) Versuche mit hoher Belastung.

Da es sich als unrationell erwies, die Versuchsperson größere Gewichte zugleich mit der Gasuhr tragen zu lassen, weil die Anbringung der Last an der Tragevorrichtung Beschwerden und durch unzuweckmäßige Haltung der Versuchsperson Fehler verursachte, wurde bei Belastung über 20 kg ein Tornister der k. u. k. Armee verwendet, in den die entsprechenden Eisen- gewichte kamen. Bei höchster Belastung wurden auch an dem mit dem Tornister verbundenen Überschwing (Leibriemen) mit Hilfe der Patrontaschen Gewichte angebracht, eine Befestigung der Last, die sich als sehr rationell und gut erträglich erwies.

c) Versuche mit geringer Belastung

wurden in der Weise ausgeführt, daß die Versuchsperson selbst die Gasuhr wie einen Tornister auf dem Rücken trug und kleinere Gewichte unterhalb derselben mit Draht befestigt wurden (Sandsäcke).

Die Versuche fanden auf dem Gange des Institutsgebäudes statt, auf dem schon Durig und seine Mitarbeiter marschiert waren. Die Versuchsstrecke betrug 155 m in einer Richtung, dann mußte in kurzem Bogen gewendet werden, an zwei Stellen mußte eine Schwenkung von 90° erfolgen, was aber bei der genügenden Breite des Ganges, außer bei den extremsten Geschwindigkeiten, das Marschtempo nicht beeinflusste. Das Steinpflaster erwies sich als für den Versuch sehr geeignet und, da ein Auslaufen von Sperrflüssigkeit der Proberohre auf den Boden durch Anbringung einer Vorrichtung nunmehr vermieden werden konnte, war ein Ausgleiten nicht zu befürchten.

Von den Gasproben wurden in der üblichen Weise Doppelanalysen ausgeführt, wobei die Sauerstoffabsorption über Natrium- hydrosulfit nach der Angabe von Durig<sup>1)</sup> erfolgte. Die Analysen wurden meist noch am Tage des Versuches, nur selten am darauffolgenden Tage erledigt. Nur solche Analysen, die miteinander bis auf  $\frac{1}{1000}\%$  übereinstimmten, wurden verwendet, solche mit größerer Differenz der Doppelanalysen ausgeschaltet.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 4, 65, 1907.

Alle Versuche wurden in nüchternem Zustande, d. h. mindestens zwei Stunden nach Einnahme einer Tasse Tee mit Zucker ausgeführt, die letzte Mahlzeit lag 12 Stunden zurück, so daß der Einfluß einer Verdauungsarbeit ausgeschlossen schien.

Fast täglich wurde das Gewicht der Versuchsperson bestimmt. Zur Vermeidung von Ermüdungserscheinungen, welche das Resultat hätten beeinflussen können, wurden an einem Tage (die Versuche fanden meistens zwischen 9 und 12 Uhr vormittags statt) nie mehr als höchstens 6, bei hohen Belastungen und hohen Geschwindigkeiten bloß 4 Versuche ausgeführt. Zwischen den Versuchen wurde die Versuchsperson entlastet.

Da es von Wichtigkeit war, daß beim einzelnen Versuch gleichmäßige, aber in jedem Versuch verschiedene Geschwindigkeiten eingehalten wurden, führte die Versuchsperson in jedem Falle einen Vormarsch aus, während dessen die beobachtende Person mit der Stoppuhr in der Hand die Geschwindigkeit kontrollierte und eventuell korrigierte. Vorher war natürlich der übliche „Spül“marsch<sup>1)</sup> erfolgt. Im eigentlichen Marsch wurde dann mit Hilfe von Marken auf den einzelnen Teilen des Weges fortwährend nachkontrolliert. Es zeigte sich, daß, von den extremsten Geschwindigkeiten abgesehen, während des Marsches die Geschwindigkeit auf ein Prozent genau eingehalten wurde.

Die Märsche, die mit hoher Belastung oder extremer Geschwindigkeit auszuführen waren und die Versuchsperson anstrengen mußten, wurden naturgemäß immer als letzte an den einzelnen Versuchstagen ausgeführt, um jede Nachwirkung auf spätere Versuche auszuschließen. Die eigentliche Versuchsdauer ohne Spül- und Vormarsch schwankte zwischen 10 Minuten (geringste Arbeitsleistungen pro Minute) und 2 Minuten (größte Arbeitsleistungen pro Minute).

Die unvermeidlichen kleinen Schwankungen im Gewichte der Versuchsperson wurden nicht in der Belastung ausgeglichen, aber jedesmal durch Wägung festgestellt und bei der Berechnung berücksichtigt. Temperatur und Luftdruckveränderungen wurden natürlich in der üblichen Weise in Rechnung gezogen.

Bei der Berechnung der Versuche wurde als Erhaltungsumsatz der Versuchsperson pro Minute der Wert von 1083 cal. angenommen und in Abzug gebracht, der aus einer großen An-

<sup>1)</sup> Vgl. Durig, Arch. f. d. ges. Physiol. 113, 235.

zahl von Versuchen an der Versuchsperson gewonnen worden war. Es ist zu bemerken, daß hierbei nicht nur aus den schon erwähnten Gründen eine gewisse Willkür herrscht, da es ja möglich ist, daß bei der Arbeit ein Bruchteil der Energie, der z. B. zur Erhaltung der Körpertemperatur in der Ruhe aufgewendet wird, gar nicht in Abzug zu bringen ist, ja daß diese Energie vielleicht, da die Arbeitsleistung ohnehin die Körpertemperatur erhöht, vom Organismus erspart wird.

Es war aus technischen Gründen nicht möglich, die ausgedehnte Versuchsreihe an mehr als einer Versuchsperson auszuführen. Ist es aus diesem Grunde vielleicht nicht erlaubt, ohne weiteres die Resultate zu verallgemeinern, so ist es andererseits doch möglich, auf Grund der großen Zahl der Versuche den Vorgang genauer zu analysieren. Es wurden im ganzen 89 Versuche vollständig ausgeführt, diese ergaben fast durchwegs untereinander sehr gut vergleichbare Resultate, was sich aus der zumeist vollkommenen Übereinstimmung der Resultate von an verschiedenen Tagen ausgeführten Parallelversuchen ergab (siehe Generaltabelle). Wie für alle bisher mit der gleichen Methodik ausgeführten Untersuchungen, sind die Resultate bei maximalen Arbeitsleistungen, namentlich wo diese durch starke Zunahme der Geschwindigkeit erzielt wurden, etwas weniger exakt, weil durch die wachsenden Widerstände der Gasuhr und der Schlauchleitungen bei dem Durchgang unverhältnismäßig größerer Luftmengen, sowie den dabei auftretenden größeren Fehlern in der Registrierung Ungleichmäßigkeiten auftreten, ein Übelstand, den auszumerzen vorläufig keine Möglichkeit gegeben scheint.

Bezüglich der Berechnung der Versuchsergebnisse ist zu bemerken, daß entsprechend der Zunahme der gemessenen Gasvolumina mit Zunahme der Leistung auch andere Gasuhrkorrekturen zugrunde gelegt werden mußten, um die an der Gasuhr abgelesenen Gasvolumina möglichst dem wahren Werte zu nähern; nichtsdestoweniger können wir jedoch das Bedenken nicht unterdrücken, daß bei den maximalen Leistungen, bei denen die Ventilation bis nahe auf 50 l in der Minute anstieg, der Wert für das gemessene Volum und damit auch der des berechneten Energieverbrauches nur mit einer gewissen Reserve wiedergegeben werden kann.

Die Versuchsergebnisse wurden, um die daraus sich ergebenden Tatsachen möglichst gründlich nach verschiedenen Gesichtspunkten untersuchen zu können, in verschiedener Weise geordnet, und zwar zunächst nach der Belastung der Versuchspersonen in 6 Gruppen geteilt, und in jeder von diesen für sich nach der eingehaltenen Geschwindigkeit — daher auch nach der Größe der Minutenleistung in  $\text{kg} \times \text{m}$  horizontal geordnet (General-tabelle). Durch graphische Interpolation wurden aus diesen Werten die in Fig. (1 bis 6) gezeichneten Kurven gewonnen. Jede einzelne der 6 Kurven zeigt, wie sich bei einer bestimmten Belastung der Versuchsperson der Energieverbrauch bei zunehmender Geschwindigkeit verhält.

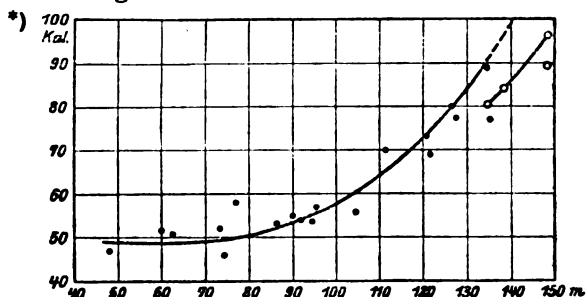


Fig. 1.

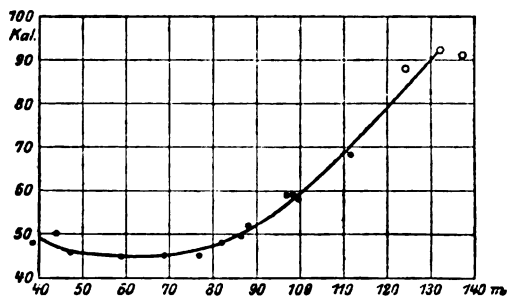


Fig. 2.

### Einfluß der Geschwindigkeit und optimale Geschwindigkeit.

Die Form aller sechs Kurven ist im großen ganzen eine ähnliche. Gleichzeitig stimmt der Verlauf der Kurve auch mit den von Durig und seinen Mitarbeitern für den Marsch bei verschiedenen Geschwindigkeiten und bei Belastung mit der

\*) In Fig. 1 bis 6 entsprechen die Werte an der Ordinatenachse 0,01 kleinen calorien.

Gasuhr (11 kg) gefundenen Kurven ziemlich gut überein.

Sämtliche Kurven beginnen mit einem ganz oder annäherungsweise horizontalen Schenkel unterhebensich in ihrem späteren Verlaufe mehr oder weniger steilempor.

Bezüglich des Verlaufs der Kurve 1 (Gehen in unbelastetem Zustande) wäre speziell folgendes zu sagen: Die ökonomische Maximalgeschwindigkeit, d. h. also jene, oberhalb welcher der Zuwachs des Energieverbrauches für die Einheit zunehmender Leistung beginnt, liegt bei etwa 85 m

in der Minute. Von da an steigt der Energieverbrauch zuerst pro m/kg Leistungszuwachs und pro Minute, bezogen auf das m und kg um 1,7 pro Mille seines Wertes. Bei der Geschwindigkeit von 100 bis 130 m pro Minute beträgt die Zunahme im Mittel 2,4 pro Mille des jeweiligen Wertes, wobei wir als Grenzzahlen 2,2 und 2,7 pro Mille ermittelten.

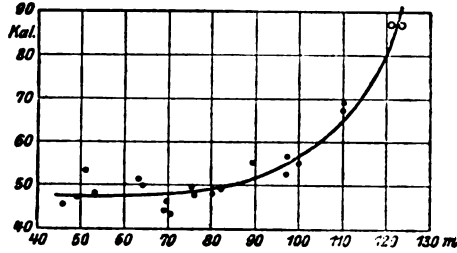


Fig. 3.

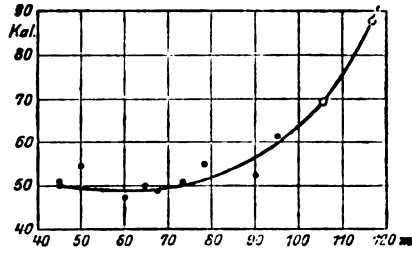


Fig. 4.

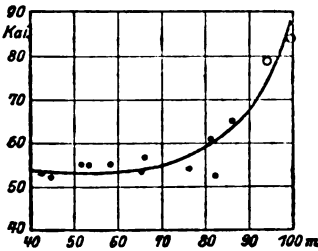


Fig. 5.

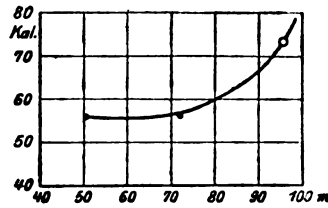


Fig. 6.

Ganz analog liegen die Verhältnisse im allgemeinen bei der folgenden Kurve (Fig. 2), nur daß hier der Zuwachs des Verbrauches oberhalb der ökonomischen Maximalgeschwindigkeit im Mittel 2,5 pro Mille des jeweiligen Wertes für das m und kg beträgt. Dieses Ergebnis steht in recht guter Übereinstimmung mit den

bereits von Durig und seinen Mitarbeitern beschriebenen Verhältnissen. In den damaligen Versuchen wurde für  $1 \text{ kg} \times 1 \text{ m}$  Leistungszuwachs pro Minute eine Steigerung des Umsatzes pro m und kg um 2,2 bis 2,9 pro Mille des Wertes, der die Größe des Umsatzes bei einer bestimmten Geschwindigkeit ausdrückt, beobachtet. Bezüglich der Art der Berechnung sei an diesem Orte auf die ausführliche Darlegung in der genannten Abhandlung verwiesen (S. 279). Es sei hier nur erwähnt, daß wir für die Umrechnung der Arbeit bei der Fortbewegung eines kg entlang einem m Weg in mkg den Faktor 0,07 pro mkg verwendeten<sup>1)</sup>.

Bezüglich der genannten beiden Kurven sind allerdings noch einige Bemerkungen hinzuzufügen. Bei Kurve 1 liegen die Werte für den Energieverbrauch bei Geschwindigkeiten über 130 m auffallend niedriger als wir erwarten möchten, wenn auch die Verbindung dieser Werte untereinander einem Verlauf der Kurve entspricht, der dem Typus der ausgezogenen Kurve gleichkommt. Wir glauben, wenn wir auch ein gewisses Mißtrauen gegen diese Werte nicht unterdrücken konnten, sie doch nicht einfach eliminieren zu dürfen und haben daher für sie ein eigenes Bruchstück einer Kurve gezeichnet. Die Kurve 2 ist insofern bemerkenswert, als der Verbrauch bei ganz langsamem Gehen etwas größer als bei der ökonomischen Geschwindigkeit war. Inwieweit hierbei das absichtlich gekünstelte, willkürlich gehemmte Gehen als Ursache in Betracht gekommen ist, läßt sich nicht entscheiden. Immerhin ist es jedoch wahrscheinlich, daß dieses Moment bei den ganz geringen Geschwindigkeiten erhöhend auf den Umsatz für die Einheit der Leistung eingewirkt hat. Zu bemerken ist ferner, daß die Werte für den

<sup>1)</sup> Will man nach der von Durig und Reichel aufgestellten Gleichung die Konstante berechnen, so ist eine gewisse Willkür naturgemäß unvermeidlich. Setzt man nun beim Marsch ohne tote Last für den Umsatz innerhalb der Omg 0,50 cal., für Omg 85 m, beim Marsch mit 11 kg Belastung 0,47 cal. bzw. 80 m ein, und für den Umsatz bei verschiedener Geschwindigkeit die aus den Kurven sich ergebenden Werte, so erhält man für  $K$ :

Geschwindigkeit	70 kg	81 kg
90 m	—	0,0101
100 „	0,0105	0,0113
110 „	0,0101	0,0123
120 „	0,0108	0,0129
130 „	0,0117	0,0129

$K$  ist demnach tatsächlich eine Konstante, die Kurven Fig. 1 und 2 Exponentialkurven. Für die übrigen Kurven trifft dies nicht mehr zu.

Umsatz im Zuge der ökonomischen Geschwindigkeiten bei der Versuchsperson überhaupt außerordentlich niedrig gewesen ist, daß also die Versuchsperson absolut ökonomischer marschierte, als Durig, Rainer und Reichel und Kolmer. Der Wert für den ökonomischer Leistung entsprechenden Bereich der Kurve liegt zwischen 0,450 und 0,475 Cal., während von Durig und seinen Mitarbeitern stets Werte von mehr als 0,5 Cal. pro kg über ein m Horizontalmarsch gefunden wurden, dagegen ist die ökonomische Maximalgeschwindigkeit der Versuchsperson geringer als bei den erstgenannten mit Ausnahme von Kolmer. Ersteres erklärt sich vielleicht dadurch, daß die zuerst bei der Versuchsperson erhaltenen Resultate wegen verschiedener kleiner technischer Mängel nicht verwertet wurden, während der späteren Reihen war die Versuchsperson, da sie auch in einer anderen Versuchsreihe ähnliche Horizontalmärsche ausführte, für die betreffende Arbeitsleistung besonders trainiert. Deshalb zeigte sich auch im Verlauf der weiteren Versuche trotz ihrer monatelangen Dauer kein ausgesprochener Einfluß der Übung (Tabelle I), indem auch zeitlich weit auseinanderliegende Werte für die gleiche Arbeitsleistung in weitestem Grade übereinstimmten, was auch für die exakte Durchführung der Versuche spricht.

Tabelle I.

Nummer	Datum	Geschwindigkeit	Gewicht	Umsatz in Calorien pro kg und 1 m horizontal
24	16. III.	97,38	81,0	0,5917
44	28. IV.	97,36	81,0	0,5887
45	28. IV.	99,20	81,0	0,5798
32	4. IV.	85,95	71,5	0,5348
113	21. IV.	75,61	71,0	0,5746
37	20. IV.	68,89	91,75	0,4359
110	21. VI.	69,23	91,0	0,4750

Die Kurve 3 (mit 21 kg Belastung) verläuft ähnlich der vorhergehenden. Auch sie liegt in ihrem Anfangsteile etwas tiefer als die Kurve 1. Der weitere Verlauf ist etwas steiler, was darin zum Ausdruck kommt, daß die Zunahme für die Leistung beim Leistungszuwachs von 1 mkg schließlich bis auf 3,7 pro Mille ansteigt. Die ökonomische Maximalgeschwindigkeit liegt noch immer etwas über 80 m.

Kurve 4 (mit 33 kg Belastung) verläuft ziemlich parallel der vorhergehenden und im ganzen etwas nach oben zu ver-

schoben, so daß also sämtliche Werte für den Energieverbrauch bei gleicher Leistung ( $\text{kg} \times \text{m horiz.}$ ) höher liegen, als bei der besprochenen Kurve. Der Verlauf des aufsteigenden Schenkels entspricht ungefähr der vorhergehenden Kurve.

Kurve 5 liegt wieder in ihrem Gesamtverlauf weiter nach oben gerückt. Für die ökonomische Maximalgeschwindigkeit zeigt sie nur mehr einen Wert von etwa 70 m an. Dies gilt auch, soweit zu entnehmen, für die nur aus 3 Werten entnommene, somit etwas hypothetische Kurve 6 (53 kg Belastung). Es war der Versuchsperson nicht möglich, die Geschwindigkeiten, die von den von Caspari untersuchten Dauergängern erreicht wurden, einzuhalten; die wenigen Versuchsergebnisse mit höchster Geschwindigkeit, die aus den schon angeführten technischen Uebelständen ziemlich differierende Werte ergaben und deshalb sich in der Kurve nicht vollständig verwerten ließen, scheinen aber in dem Sinne zu sprechen, daß ein weiteres gleichmäßiges Ansteigen des Verbrauches dabei nicht mehr stattfindet. Ob dies mit einer gewissen Insuffizienz der Atmung bei solchen extremen Anstrengungen zusammenhängt (es trat ja dabei immer einige Minuten dauernde Dyspnoe ein), läßt sich nicht sicher sagen, wahrscheinlich ist es, daß die Gasuhr so große Luftvolumina nicht mehr richtig registriert.

#### Optimalbelastung.

Wenn wir im vorhergehenden bestrebt waren zu ermitteln, innerhalb welcher Grenzen die Marschgeschwindigkeit bei verschiedener Belastung schwanken kann, ohne daß wesentliche Unterschiede im Energieverbrauch für die Einheit der Arbeit auftreten, so war es weiter unsere Aufgabe zu bestimmen, ob sich ebenso wie eine optimale Geschwindigkeit, auch eine optimale Belastung beim Gehen auf horizontaler Bahn bestimmen lasse.

Trägt man die Werte für Umsatz und Last graphisch auf, so zeigt sich in der Tat, daß bei der Versuchsperson eine Last bis zu 20 kg oder vielleicht noch ein wenig darüber angebracht werden kann, ohne daß eine Steigerung des Umsatzes pro kg und m nachweisbar wäre. Natürlich gilt das nur unterhalb der ökonomischen Maximalgeschwindigkeit. In Tab. II sind die Umsatzwerte für die unterhalb der ökonomischen Maximalgeschwindigkeit gelegenen Arbeitsleistungen für jede



einzelne Belastung zusammengestellt und die dazugehörigen Durchschnittszahlen berechnet. Diese letzteren zeigen recht deutlich, daß bei geringer Belastung der Umsatz unterhalb der ökonomischen Maximalbelastung nicht bloß gleich, sondern sogar etwas geringer ist als beim Marsch ohne oder mit starker Belastung. Es ergibt sich also daraus, daß die tote Last innerhalb gewisser Grenzen ökonomischer fortbewegt wird als der eigene Körper.

Tabelle II.

Nr.	Ohne Belastung		Nr.	Mit ca. 11 kg Belastg.		Nr.	Mit ca. 21 kg Belastung	
	Geschwindigkeit pro Minute in Metern	Umsatz für 1 kg längs 1 m in cal.		Geschwindigkeit pro Minute in Metern	Umsatz für 1 kg längs 1 m in cal.		Geschwindigkeit pro Minute in Metern	Umsatz für 1 kg längs 1 m in cal.
117	59,67	0,5193	102	58,96	0,4485	58	62,74	0,5189
118	61,93	0,5105	134	69,01	0,4499	72	64,73	0,4967
119	73,37	0,5238	103	76,86	0,4513	37	(68,89)	(0,4359)
88	74,25	0,4620	147	82,12	0,4800	110	69,23	0,4750
113	75,61	0,5746	Mittel 71,76 0,4574		36	(69,75)	(0,4288)	
32	85,95	0,5348			50	74,81	0,4992	
Mittel 71,79		0,5208			51	76,46	0,4761	
					73	80,00	0,4841	
					59	81,58	0,4859	
					72,81 * Mittel 72,03		49,09 * 0,4778	

\* Unter Auslassung von Nr. 36 und 37.

Nr.	Mit 33 kg Belastung		Nr.	Mit 43 kg Belastung		Nr.	Mit 53 kg Belastung	
	Geschwindigkeit pro Minute in Metern	Umsatz für 1 kg längs 1 m in cal.		Geschwindigkeit pro Minute in Metern	Umsatz für 1 kg längs 1 m in cal.		Geschwindigkeit pro Minute in Metern	Umsatz für 1 kg längs 1 m in cal.
97	61,45	0,4710	112	44,08	0,5174	125	50,96	0,5579
94	64,60	0,4960	84	52,25	0,5499	126	72,38	0,5604
96	67,22	0,4880	83	52,69	0,5488	Mittel 61,67		0,5591
99	72,85	0,5060	121	57,89	0,5526			
Mittel 66,53		0,4902	33	65,26	0,5316			
			34	66,42	0,5680			
			81	75,55	0,5380			
			Mittel 59,16		0,5437			

Einen Überblick über den Einfluß der Last auf den Verbrauch bei verschiedener Geschwindigkeit ergibt die nachstehende Tabelle III, in der die Mittelwerte der Versuche, oder insoweit

solche nicht berechnet werden konnten, dafür bezügliche Einzelversuche (mit \* bezeichnet) eingetragen sind.

Tabelle III.  
Umsatz in cal. pro kg und 1 m horizontal.

Gewicht d. Versuchsperson kg	Geschwindigkeit in Metern pro Minute							
	50	60	70	80	90	100	110	120
70	0,4865*	0,5082	0,5083	0,5170	0,5372	0,5658	0,6528	0,7070
81	0,4633	0,4662	0,4640	0,4740	0,5313	0,6019	0,6887	0,8131
91	0,4899	0,4977	0,4546	0,4982	0,5346	0,6052	0,7245	0,8573
103	0,4856	0,4843	0,5062	0,5230	0,5753	0,6510	0,7735	—
113	0,5422	0,5450	0,5752	0,5699	0,6903	0,8425*	—	—
123	0,6474*	—	0,6728*	—	0,6953*	—	—	—

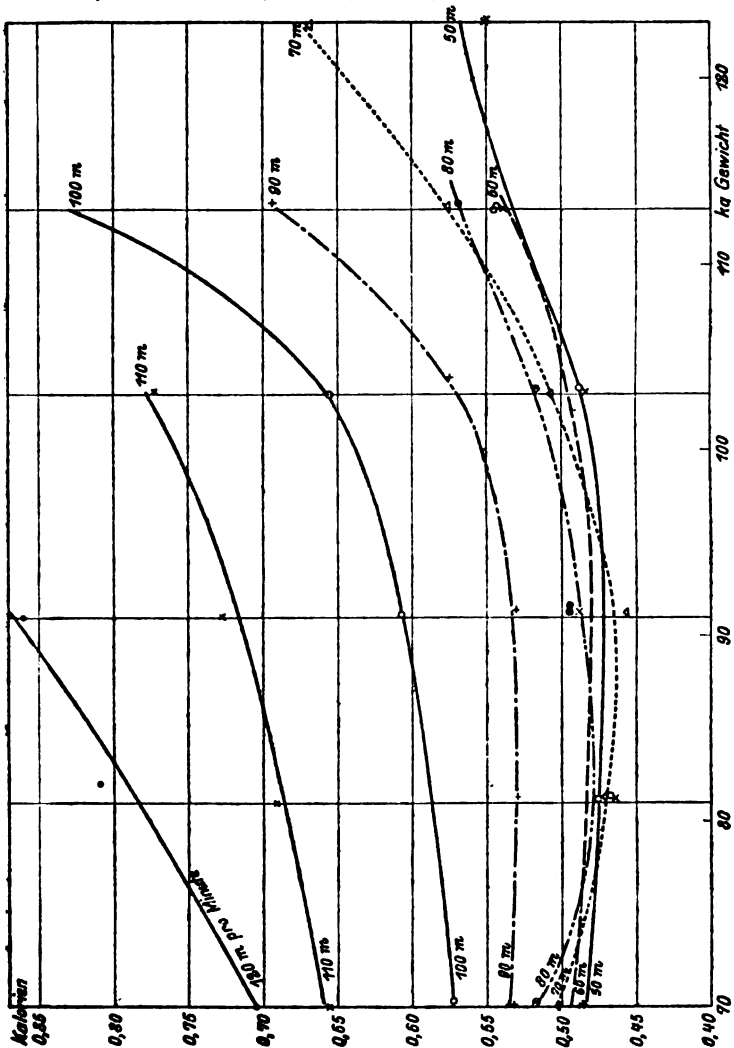


Fig. 7.

Aus diesen Zahlen wie aus Fig. 7, der die Werte dieser Tabelle zugrunde gelegt sind, ergibt sich, daß schon bei der Geschwindigkeit von 90 m pro Minute jede Last, auch der eigene Körper, unökonomischer befördert wird als bei geringerer Geschwindigkeit. Es darf dies auch nicht wundernehmen, da wir uns hierbei ja schon oberhalb der ökonomischen Maximalgeschwindigkeit unserer Versuchsperson befinden. Im großen und ganzen ist der Verlauf dieser Kurve allerdings noch ziemlich analog dem Verlauf der Kurve beim Gehen mit geringerer Geschwindigkeit, und es läßt sich insoweit noch eine Ökonomie konstruieren, als man aus dem Verlauf der Kurve entnehmen kann, daß bei dieser Geschwindigkeit ein Zuwachs der Last um etwa 20 kg über das lebende Gewicht noch zu keiner weitergehenden Störung der Ökonomie führt, während eine Erhöhung der Last auf größere Werte zu einem ganz ähnlichen Absinken der Ökonomie führt, wie wir dies bei zunehmender Geschwindigkeit als gesetzmäßig beobachtet haben. Der Zuwachs des Energieverbrauches steigt demnach bei Zunahme der Last oberhalb der Grenze dieser Ökonomie nicht linear, sondern steiler an. Bei Steigerung der Geschwindigkeit über 90 m tritt jedoch ein Wendepunkt im Verhalten ein. Denn wir sehen, daß von nun an, mag Geschwindigkeit oder Last zunehmen, eine ökonomische Beförderung der Last nicht mehr gefunden werden konnte. In jedem Falle steigt bei Zulage eines Gewichtes zur lebendigen bewegten Masse sofort der Energieverbrauch für die Arbeitseinheit an, wie auch jeder Geschwindigkeitszuwachs bei entsprechend gleicher Last einen um so größeren Zuwachs an Energieverbrauch fordert, je größer die Geschwindigkeit oder die Last war.

#### Ökonomische Form der Arbeitsleistung.

Es schien wertvoll, die Resultate noch nach einem weiteren Gesichtspunkte zu ordnen. Stellt man nämlich die Versuche in Parallele, bei denen trotz verschiedener Belastung und Geschwindigkeit das Produkt von Weg und Last dasselbe ist, also in der Zeiteinheit die gleiche Arbeit geleistet wurde, so gewinnt man einen Überblick über die Art, wie eine Leistung unter Variieren von Geschwindigkeit und Last ökonomisch ausgeführt werden kann. Die Werte hierfür ließen sich auf zweifache Weise gewinnen. Entweder durch Rechnung oder gra-

phisch. Nachstehende Tabelle gibt Mittelwerte des Verbrauches in Calorien pro Kilogramm und Meter horizontal, geordnet nach verschiedener Leistung und verschieden großer Belastung auf Grund der Berechnung.

Tabelle IV.  
Umsatz in cal. pro kg und 1 m horizontal.

Gesamtgewicht	Minutenleistungen in kg $\times$ m horizontal								
	4000	5000	6000	7000	8000	9000	10000	11000	12000
70	0,4999	0,4978	0,5093	0,5640	0,6901	0,7867	0,8652	—	—
81	0,4630	0,4323	0,4469	0,4990	0,5913	0,6814*	0,8804*	0,9185*	—
91	0,4332	0,5106	0,4618	0,4757	0,5436*	0,5576	0,7252	0,8717	—
103	0,4690	0,5332*	0,4440*	0,4920	0,5485*	0,4981*	0,6060*	0,7012*	0,8181*
113	0,4957	0,5331	0,5560	0,5465	0,5825	0,5526	0,6959	0,7995*	—
123	—	—	0,5340*	—	—	0,5665*	—	0,6907	0,7105*

Es ist zu dieser Tabelle zu bemerken, daß trotz der großen Zahl von Versuchen nicht für jedes Produkt zwischen 4000 und 12000 kg  $\times$  m Werte vorgelegen haben, diese fielen begreiflicherweise größtenteils zwischen die angegebenen Wertgrenzen so, daß z. B. in die Kolumne 5000 Mittel aus jenen Werten eingetragen wurden, bei denen die Leistung 4500 bis 5500 kg  $\times$  m horizontal betrug. In jenen Fällen, in denen nur ein einzelner Wert vorlag, kann dieser natürlich von dem in der Überschrift der Kolumne namhaft gemachten ganz wesentlich abweichen. Diese Werte sind mit einem \* bezeichnet.

Als zweckmäßig erwies sich für einen geeigneten Überblick das graphische Verfahren (siehe Fig. 8).

Durch eine einfache Rechnung wurde gefunden, welchen Geschwindigkeiten bei verschiedenem Gesamtgewicht der Versuchsperson bestimmten gleichen Leistungen in der Minute entsprechen; z. B. eine Minutenleistung von 7000 kg  $\times$  m horizontal wird erzielt, wenn die Versuchsperson mit 10 kg belastet, im ganzen also 80 kg schwer ist, durch Einhaltung einer Geschwindigkeit von  $7000 : 80 = 87,5$  m pro Minute. Bei gleicher Gesamtleistung und bei Belastung der Person mit 30 kg (also einem gesamten zu befördernden Gewichte von 100 kg) hätte dagegen die Geschwindigkeit nur 70 m pro Minute betragen müssen. Diese Rechnung wurde für 4000, 5000 usw. bis

11000 kg × m Weg in der Minute und für Gewichte von 70, 80, 90, 103, 113, 123 kg ausgeführt. Die so gefundenen Geschwindigkeitswerte wurden auf den Fig. 1 bis 6 als Abszissen aufgesucht, die Schnittpunkte der Kurven mit den entsprechenden Ordinaten ergaben durch einfache Ablesung die entsprechenden Calorienwerte, die zur Konstruktion der Kurven in Fig 8 ver-

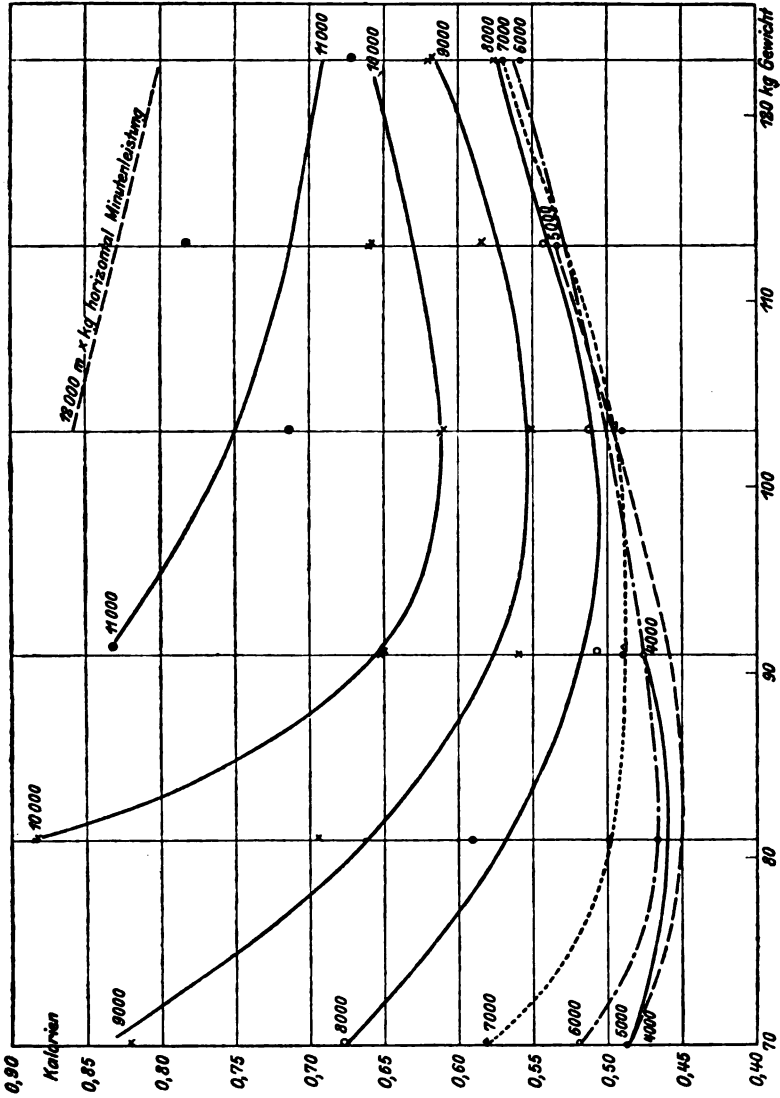


Fig. 8.

wendet wurden. Jede Kurve der Fig. 8 gilt für eine und dieselbe Minutenleistung, erzielt durch Marsch bei verschiedener Geschwindigkeit und wechselnder Belastung unter Gleichbleiben von deren Produkt. Der Verlauf der Kurve ist je nach der Größe der Arbeitsleistung in der Minute verschieden. Die Kurven für geringe Minutenarbeit (4000 bis 7000 unserer Arbeitseinheiten) haben ihr Minimum bei einem Gesamtgewicht der Versuchsperson von 80 bis 90 kg (10 bis 20 kg toter Last), mit anderen Worten: geringe Arbeitsleistungen beim Horizontalmarsch wurden von der Versuchsperson am zweckmäßigsten in der Weise erzielt, daß diese mit geringer Belastung mäßig schnell marschierte; ging sie entweder unbelastet und entsprechend schneller oder stärker belastet und entsprechend langsamer, so war in beiden Fällen der Energieverbrauch für die gleiche Arbeitsleistung in der Zeiteinheit wesentlich größer.

Bei Arbeitsleistungen von 8000 bis 10000  $\text{kg} \times \text{m}$  horizontal in der Minute verschob sich das Minimum der Kurve etwas nach der Seite der eben besprochenen Belastung von 20 kg und lag bei 103 kg Gesamtgewicht (33 kg toter Last), d. h. sollte die Versuchsperson 8000 bis 10000  $\text{kg} \times \text{m}$  horizontal in der Minute leisten, so erfolgte diese Arbeit am ökonomischsten bei einer solchen Belastung von 33 kg und entsprechend geringer Geschwindigkeit. Sollte dieselbe Arbeit bei geringer Belastung und entsprechend größerer Geschwindigkeit geleistet werden, so war der gleichzeitige Energieverbrauch unverhältnismäßig größer. Bei stärkerer Belastung aber und langsamerem Marsch wurde gleichfalls weniger ökonomisch gegangen, doch war der Unterschied gegenüber dem Optimum nicht so groß.

Sollte endlich die Versuchsperson möglichst große Minutenleistungen (11000 bis 12000  $\text{kg} \times \text{m}$  horizontal pro Minute) erzielen, so lag der tiefste Punkt der Kurven an deren Ende, d. h. entsprechend der höchsten Belastung. Solche Arbeiten wurden daher am zweckmäßigsten bei möglichst hoher Belastung und geringer Geschwindigkeit geleistet, am unzuweckmäßigsten unbelastet bei hoher Geschwindigkeit, und zwar immer weniger ökonomisch, je größer die Minutenleistung sein sollte.

Trägt man, wie es in nebenstehender Tabelle (Fig. 9) gesehen ist, die Werte für den Verbrauch in Calorien pro kg und 1 m horizontal in ein Koordinatensystem ein, in dem die

Abzissen die Arbeitsleistungen in der Zeiteinheit, die Ordinaten den Calorienverbrauch bedeuten, so findet sich ein Feld, innerhalb dessen jede Arbeitsleistung, mag ihr Zustandekommen

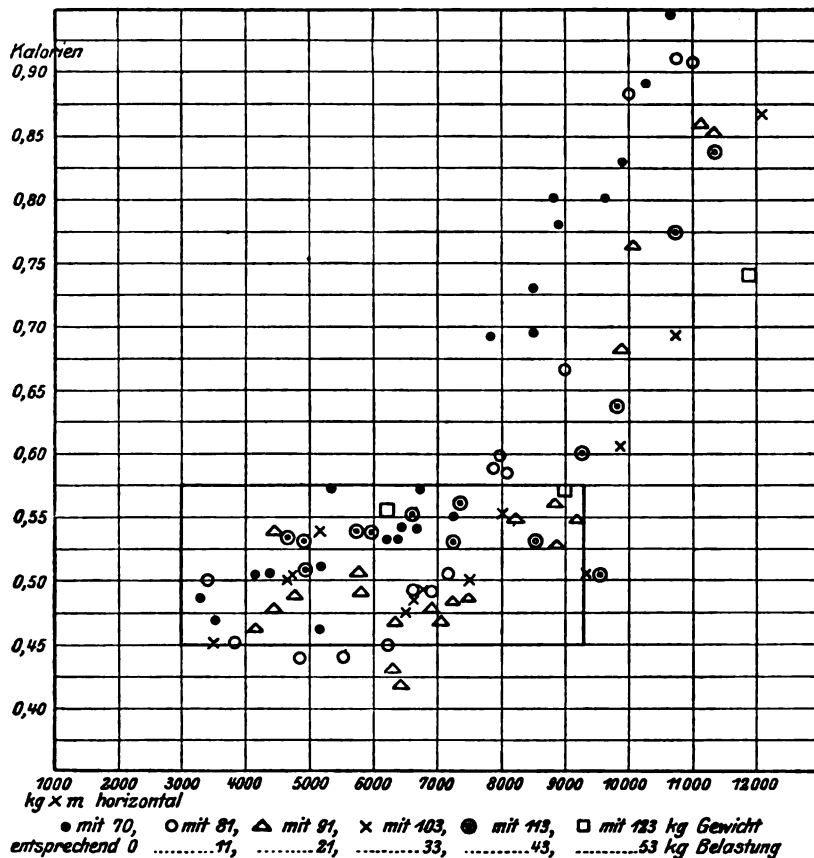


Fig. 9.

durch welche Variation auch immer von Belastung und Geschwindigkeit bedingt sein, mit annähernd dem gleichen Aufwand geleistet wird. Dieses Bereich liegt zwischen 0,45 und 0,58 Calorien einerseits, andererseits zwischen 3000 und 9000 kg x m horizontal. In seiner rechten oberen Ecke finden sich die Werte der ökonomischen Maximalleistung. Außerhalb des umschriebenen Feldes erfolgen alle Arbeitsleistungen unökonomischer.

Was die Frequenz und das Durchschnittsvolumen der Atemzüge betrifft, so ergab sich (vgl. Generaltabelle), daß ziemlich gleichmäßig sowohl die Frequenz als auch die Tiefe

Tabelle V.

Generalübersichtstabelle der ausgeführten Versuche über den Horizontalmarsch.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Versuchsnummer	Datum	Atemgröße in Litern pro Min. (reduziert)	Analyse		Pro Minute ocm		RQ	Geschwindigkeit in Metern pro Minute	Atemzüge pro Minute	Gewicht kg	Produkt aus Gewicht und zurückgelegter Wegstrecke	Umsatz pro kg und Meter Horizontalmarsch in cal.	Durchschnittsvolumen eines Atemzuges l. Lit.
			CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> prod.	O <sub>2</sub> verbr.							

## Versuche ohne Belastung.

132	30. VI.	11,72	3,83	16,27	445,4	571,9	0,779	48,40	10,9	70,0	3500	0,4709	1,07
117	26. VI.	13,06	4,12	15,95	534,1	680,4	0,785	59,67	10,9	70,0	4177	0,5193	1,20
118	26. VI.	13,10	3,99	15,89	518,5	696,6	0,744	61,93	10,8	70,0	4334	0,5105	1,22
119	26. VI.	14,37	4,13	15,67	589,2	799,0	0,737	73,37	11,3	70,0	5136	0,5238	1,26
88	15. VI.	13,85	4,19	15,93	576,1	723,0	0,797	74,25	10,5	69,6	5168	0,4620	1,31
113	21. VI.	15,33	4,10	15,48	624,0	890,7	0,701	75,61	9,6	71,0	5368	0,5746	1,60
32	4. IV.	14,68	4,25	15,08	634,0	942,0	0,673	85,95	8,3	71,5	6145	0,5348	1,77
41	25. IV.	16,30	4,42	15,40	715,5	947,0	0,756	90,08	10,6	71,0	6395	0,5354	1,43
42	25. IV.	16,58	4,38	15,40	721,1	964,8	0,747	90,74	10,5	71,0	6442	0,5411	1,57
29	4. IV.	16,64	4,43	15,21	732,1	1008,1	0,726	94,41	9,0	71,5	6750	0,5446	1,85
40	25. IV.	19,00	4,00	15,71	754,2	1052,5	0,705	95,43	—	71,0	6776	0,5700	—
89	15. VI.	19,50	4,09	15,70	791,8	1078,5	0,734	103,60	13,4	69,6	7212	0,5560	1,43
128	28. VI.	23,57	4,35	15,40	1018,2	1375,8	0,740	110,90	14,7	70,0	7763	0,6990	—
129	28. VI.	28,52	4,33	15,46	1140,4	1530,2	0,745	120,30	15,0	70,0	8417	0,7318	1,77
90	15. VI.	27,60	3,96	15,91	1084,5	1462,6	0,741	121,1	15,7	69,6	8425	0,6920	1,76
91	15. VI.	30,87	4,95	15,67	1407,6	1679,3	0,838	126,1	16,3	69,6	8774	0,8040	1,90
130	28. VI.	29,71	4,27	15,62	1259,5	1696,2	0,743	127,4	16,0	70,0	8918	0,7783	1,70
43	25. IV.	38,62	4,37	16,42	1680,0	1669,0	0,782	134,8	19,6	71,0	9569	0,8009	1,98
31	4. IV.	36,10	4,40	15,91	1624,0	1947,6	0,842	137,8	18,2	71,5	9855	0,8359	2,03
131	28. VI.	46,15	4,21	16,15	1928,0	2273,0	0,848	147,6	25,7	70,0	10333	0,9588	1,79
114	21. VI.	45,70	4,21	16,35	1919,0	2133,0	0,893	148,1	19,6?	71,0	10514	0,8881	2,32

## Versuche mit ca. 11 kg Belastung.

101	19. VI.	10,38	3,73	16,16	400,0	546,7	0,733	39,31	10,3	81,8	3215	0,4827	1,05
116	26. VI.	11,92	4,14	16,10	490,8	597,1	0,820	43,54	11,8	82,2	3479	0,5027	1,27
133	30. VI.	12,69	3,85	16,49	486,1	585,1	0,831	46,97	10,8	81,0	3805	0,4597	1,17
102	19. VI.	12,97	3,90	15,93	501,7	685,8	0,732	58,96	10,4	81,8	4803	0,4485	1,25
134	30. VI.	14,52	3,98	15,97	573,4	757,8	0,757	69,01	12,9	81,0	5590	0,4499	1,13
103	19. VI.	15,36	3,92	15,81	597,4	835,5	0,715	76,96	12,1	81,8	6295	0,4513	1,27
47	28. IV.	16,89	3,98	15,86	667,2	905,4	0,737	82,12	12,6	81,0	6652	0,4800	1,34
75	8. VI.	15,48	4,56	15,14	701,4	947,5	0,740	86,21	—	80,5	6940	0,4893	—
46	28. IV.	17,84	4,18	15,68	741,3	1011,1	0,733	88,36	12,4	81,0	7157	0,5153	1,44
44	28. IV.	20,20	4,45	15,25	894,8	1212,0	0,738	97,36	9,6	81,0	7886	0,5887	—
24	16. III.	20,60	4,57	15,35	935,1	1205,0	0,776	97,38	12,3	81,0	7888	0,5917	1,68
45	28. IV.	21,08	4,33	15,48	906,4	1212,1	0,748	99,20	12,8	81,0	8035	0,5798	1,65
76	8. VI.	24,30	4,63	15,05	1117,7	1508,6	0,741	111,00	14,3	80,5	8940	0,6769	1,70
48	28. IV.	39,58	4,13	15,93	1623,0	2060,0	0,784	124,00	19,6	81,0	10044	0,8839	2,02
49	28. IV.	46,60	3,98	16,14	1843,0	2373,0	0,788	131,87	—	81,0	10682	0,9258	—
13	30. VI.	49,36	4,32	16,41	2128,0	2253,0	0,939	135,54	—	81,0	10979	0,9168	—



Tabelle V (Fortsetzung).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Versuchsnummer	Datum	Atemgröße in Litern pro Min. (reduziert)	Analyse		Pro Minute ocm		RQ	Geschwindigkeit in Metern pro Minute	Atemzüge pro Minute	Gewicht kg	Produkt aus Gewicht und zurückgelegter Wegstrecke	Umsatz pro kg und Meter Horizontalmarsch in cal.	Durchschnittsvolum eines Atemzuges l. Lit.
			CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> prod.	O <sub>2</sub> verbr.							

## Versuche mit ca. 21 kg Belastung.

38	20. IV.	12,33	3,97	16,03	485,6	634,8	0,765	45,62	10,9	91,75	4186	0,4628	1,13
106	19. VI.	12,64	4,06	15,90	509,6	668,9	0,762	49,38	11,9	90,0	4444	0,4719	1,06
57	27. V.	13,39	4,34	15,57	577,0	753,7	0,766	50,54	10,3	91,0	4599	0,5444	1,30
109	21. VI.	13,64	4,13	15,92	559,3	714,8	0,782	53,04	12,3	91,0	4826	0,4823	1,11
58	27. V.	15,45	4,09	15,58	627,2	859,0	0,730	62,84	11,4	91,0	5718	0,5189	1,36
72	8. VI.	15,14	4,13	15,65	620,8	854,0	0,727	64,37	10,4	90,5	5859	0,4967	1,45
37	20. IV.	15,18	3,95	15,87	595,2	813,8	0,731	68,89	12,3	91,75	6321	0,4359	1,23
110	29. VI.	15,52	4,09	15,67	623,6	864,5	0,729	69,23	11,9	91,0	6300	0,4750	1,30
36	20. IV.	16,19	3,95	16,21	634,6	798,1	0,795	69,75	12,9	91,75	6399	0,4288	1,26
50	24. V.	18,27	3,80	15,96	688,7	964,5	0,714	74,81	—	92,25	6901	0,4992	—
51	24. V.	16,37	4,43	15,58	729,3	928,3	0,786	76,46	10,8	92,25	7054	0,4761	1,53
73	8. VI.	16,60	4,49	15,31	740,2	982,5	0,753	80,00	11,4	90,5	7240	0,4841	1,46
59	27. V.	17,51	4,46	15,58	775,5	978,5	0,793	81,58	12,5	91,0	7424	0,4859	1,40
107	19. VI.	20,37	4,28	15,40	865,8	1193,8	0,725	88,78	14,7	90,0	8176	0,5556	1,38
68	7. VI.	21,93	4,29	15,43	934,0	1276,1	0,732	96,58	13,5	90,5	8740	0,5650	1,62
53	24. V.	22,05	4,63	15,60	1014,3	1217,2	0,833	96,87	13,3	92,25	8939	0,5382	1,65
52	24. V.	23,12	4,75	16,10	1091,3	1151,4	0,861	99,64	—	92,25	9191	0,5544	—
39	20. IV.	32,20	4,39	15,81	1403,0	1709,0	0,821	110,00	16,3	91,75	10004	0,7602	1,98
69	7. IV.	29,02	4,58	15,45	1320,2	1660,4	0,795	110,30	14,6	90,5	9980	0,6888	1,98
54	24. V.	42,79	4,48	15,85	1903,0	2240,0	0,849	121,60	—	92,25	11215	0,8688	—
55	24. V.	45,73	4,12	16,18	1869,0	2250,0	0,831	121,60	—	92,25	11215	0,8687	—

## Mit ca. 33 kg Belastung.

104	19. VI.	11,61	3,85	16,28	443,5	564,2	0,786	34,50	11,4	103,2	3560	0,4539	1,14
93	15. VI.	14,11	4,00	16,05	560,1	776,9	0,771	44,82	—	103,6	4644	0,5080	1,15
92	15. VI.	14,17	4,17	16,09	586,7	711,4	0,825	45,28	11,9	103,6	4690	0,5020	1,19
105	19. VI.	15,03	4,19	15,74	625,1	820,4	0,762	49,76	13,0	103,2	5146	0,5475	1,16
97	16. VI.	17,08	4,00	16,16	678,2	850,7	0,797	61,45	12,5	103,6	6365	0,4710	1,37
94	15. VI.	17,49	3,99	15,89	692,5	930,3	0,744	64,60	13,8	103,6	6691	0,4960	1,27
96	16. VI.	18,12	3,97	15,99	713,8	942,1	0,758	67,22	13,7	108,6	6964	0,4880	1,32
99	16. VI.	19,09	4,12	15,80	785,8	1030,9	0,757	72,85	13,7	103,6	7547	0,5060	1,38
100	16. VI.	21,02	4,10	15,66	855,5	1173,0	0,729	77,71	14,2	103,6	8051	0,5520	1,48
98	16. VI.	22,83	4,25	15,73	963,2	1244,0	0,774	90,34	15,9	103,6	9359	0,5180	1,44
95	15. VI.	26,85	4,37	15,62	1165,4	1493,0	0,781	95,21	17,6	103,6	9364	0,6130	1,53
108	19. VI.	34,59	4,39	15,96	1508,0	1770,0	0,852	105,10	—	103,2	10844	0,6910	—
136	30. VI.	48,70	4,70	16,17	2243,0	2327,0	0,964	116,99	28,3	103,0	12049	0,8708	1,72

## Mit ca. 43 kg Belastung.

111	21. VI.	14,59	3,91	16,16	565,9	729,3	0,776	38,92	12,9	113,0	4398	0,5450	1,13
120	26. VI.	15,28	4,07	16,11	617,2	767,0	0,805	43,16	13,4	113,0	4877	0,5340	1,14
112	21. VI.	15,57	3,77	16,23	582,5	770,9	0,755	44,08	13,7	113,0	4981	0,5174	1,14
84	11. VI.	17,46	4,12	15,97	713,9	904,1	0,790	52,25	13,7	113,0	5904	0,5499	1,28
83	11. VI.	17,91	4,12	16,04	726,0	905,8	0,802	52,69	14,6	113,0	5954	0,5488	1,22
121	26. VI.	18,65	4,34	15,90	803,8	827,3	0,827	57,89	—	113,0	6542	0,5526	—
33	7. IV.	19,92	3,81	15,97	753,1	1050,9	0,717	65,26	—	111,0	7244	0,5316	—

Tabelle V (Fortsetzung).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Versuchsnummer	Datum	Atemgröße in Litern pro Min. (reduziert)	Analyse		Pro Minute ccm		RQ	Geschwindigkeit in Metern pro Minute	Atemzüge pro Minute	Gewicht kg	Produkt aus Gewicht und zurückgelegter Wegstrecke	Umsatz pro kg und Metern Horizontalmarsch in cal.	Durchschnittsvolumen eines Atemzuges l. Lit.
			CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> prod.	O <sub>2</sub> verbr.							

## Mit ca. 43 kg Belastung.

34	7. IV.	21,11	3,85	15,93	806,5	1211,1	0,719	66,42	13,3	111,0	7373	0,5680	1,59
81	9. VI.	23,37	3,86	16,07	894,5	1198,6	0,747	75,55	17,1	113,0	8537	0,5360	1,37
124	27. VI.	24,99	4,48	15,64	1111,9	1376,7	0,808	80,55	17,6	113,0	9103	0,6087	1,42
86	11. VI.	24,04	4,07	15,96	988,0	1247,6	0,789	82,00	—	113,0	9266	0,5191	—
80	9. VI.	28,52	4,24	15,76	1200,5	1545,5	0,777	86,29	17,9	113,0	9751	0,6455	1,59
122	26. VI.	35,94	4,57	15,73	1637,0	1936,0	0,845	94,43	19,8	113,0	10670	0,7755	1,82
79	9. VI.	40,30	4,73	15,72	1894,0	2150,0	0,880	99,45	19,3	113,0	11238	0,8377	2,09

## Mit ca. 53 kg Belastung.

125.	27. VI.	20,13	3,88	16,39	774,9	950,0	0,816	50,96	17,4	123,0	6268	0,5579	—
126.	27. VI.	25,59	3,96	16,19	1005,6	1266,6	0,794	72,38	20,1	123,0	8903	0,5604	—
127.	27. VI.	42,65	4,18	16,35	1758,0	2000,0	0,885	95,50	25,5	123,0	11746	0,7378	—

der Atemzüge bei der Zunahme der Arbeitsleistung eine Steigerung zeigte, so daß schließlich deren Produkt, die Größe des pro Minute geförderten Atemvolumens, für die gleiche Arbeitsleistung ungefähr identisch ist, gleichgültig durch welche Kombination der beiden Faktoren, Geschwindigkeit und Belastung, die Arbeitsleistung zustande gekommen ist. Es zeigt sich, daß die angewendete zweckmäßige Form der Anbringung der Last einen wesentlichen Einfluß auf den Atemtypus der Versuchsperson nicht ausübt, da für gleiche Arbeitsleistungen die Zahl der Respiration pro Minute ganz ähnlich war. Kurz sei darauf hingewiesen, daß wie Reach und Röder<sup>1)</sup> gezeigt haben, der Aufwand für die Atemarbeit verschieden beeinflusst ist, je nachdem die Tiefe oder die Frequenz der Atmung sich vermehrt.

## Zusammenfassung der Resultate.

Aus der vorliegenden Untersuchung ergibt sich für den Horizontalmarsch:

## 1. In bezug auf den Einfluß der Geschwindigkeit:

In Übereinstimmung mit den Resultaten der Untersuchungen von Durig und seinen Mitarbeitern zeigte sich, daß der Umsatz bis zu einer bestimmten Geschwindigkeit von der Größe

<sup>1)</sup> Reach und Röder, diese Zeitschr. 22, 1909.

dieser unabhängig ist. Diese Geschwindigkeitsgrenze (ökonomische Maximalgeschwindigkeit) betrug bei der Versuchsperson für den Marsch ohne oder mit geringer Belastung (bis etwa 21 kg) ungefähr 85 m. Für höhere Belastungen lag die Maximalgeschwindigkeit tiefer. Bei weiterer Zunahme der Geschwindigkeit nimmt der Verbrauch pro kg und m horizontal (d. i. für die Arbeitseinheit) stetig zu. Die Zunahme erfolgt beim Marsch ohne oder mit 11 kg Last annähernd in Form einer Exponentialkurve. Beim Marsch mit stärkerer Belastung ist die Zunahme des Verbrauchs größer als bei geringerer Belastung.

#### 2. Hinsichtlich des Einflusses der Belastung:

Lasten bis zu 21 kg wurden beim Marsche innerhalb der ökonomischen Maximalgeschwindigkeit meist mit weniger, sonst aber mit gleichem Energieaufwand für die Arbeitseinheit getragen wie der eigene Körper. Das Tragen größerer Lasten hatte absolute und relative Zunahme des Aufwandes bei gleiche Geschwindigkeit zur Folge. Desgleichen war dann die prozentuelle Zunahme des Umsatzes bei gleich starker Steigerung der Geschwindigkeit eine größere. Die ökonomische Maximalbelastung lag also für die Versuchsperson innerhalb der ökonomischen Maximalgeschwindigkeit, unterhalb 21 kg; oberhalb der ökonomischen Maximalgeschwindigkeit hatte jede Belastung ein im steigenden Maße unökonomisches Gehen zur Folge.

#### 3. Hinsichtlich der Arbeitsleistung in der Zeiteinheit:

Geringe Arbeitsleistungen wurden mit relativ geringstem Aufwand, also ökonomisch beim Gehen mit Belastung bis 21 kg unter Einhaltung entsprechend mäßiger Geschwindigkeiten erzielt. Je größere Arbeitsleistungen zustande kommen sollten, um so zweckmäßiger (ökonomischer) war es, diese nicht durch Steigerung der Geschwindigkeit, sondern durch größere Belastung zu erreichen.

4. Hinsichtlich des Atemtypus zeigte es sich, daß entsprechend der Zunahme der Last das pro Minute geförderte Atemvolum sich vergrößerte, sowohl durch Steigerung der Frequenz als Zunahme der Atemtiefe. Ein Einfluß der Belastung in dem Sinne, daß die Atmung dadurch flacher und entsprechend frequenter geworden wäre, ließ sich bei der gewählten Versuchsanordnung nicht nachweisen.

---

## Zur Kenntnis der Reduktionsfermente.

### III. Mitteilung.

#### Vorkommen eines Kofermentes der Perhydridase in tierischen Geweben.

Von  
A. Bach.

(Aus dem Privatlaboratorium des Verfassers, Genf).

(Eingegangen am 27. November 1911.)

In der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> wurde erwähnt, daß die Filtrate von stark reduzierenden Leberemulsionen völlig inaktiv sind, während die Rückstände ihre reduzierenden Eigenschaften beibehalten. Quantitative Versuche ergaben, daß das Reduktionsvermögen dieser Rückstände beträchtlich geringer ist als das der nicht filtrierten Leberemulsionen. Da das reduzierende Agens der Gewebe sich als ein zusammengesetztes System Perhydridase — wasserspaltende Substanz — Wasser erwiesen hat, so lag die Annahme nahe, daß die beobachtete Herabsetzung des Reduktionsvermögens auf das Entfernen eines Anteils der wasserspaltenden, als Koferment fungierenden Substanz zurückzuführen ist. Sollte diese Annahme zutreffen, so dürften die an und für sich unwirksamen Filtrate im Verein mit der für sich allein ebenfalls unwirksamen Milchperhydridase ein reduzierendes System herstellen. Dies ist tatsächlich der Fall. Filtrierte Extrakte verschiedener Gewebe enthalten eine kochbeständige Substanz, die in Gegenwart von frischer, ungekochter Milch sowohl Farbstoffe zu Leukobasen wie Nitrate zu Nitriten reduzieren. In Gegenwart von gekochter Milch bleiben sämtliche Reduktionsreaktionen völlig aus.

Um einige Aufschlüsse über die hier obwaltenden Verhältnisse zu gewinnen, benutzte ich die von mir in der zweiten

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 31, 443, 1911.

Mitteilung<sup>1)</sup> beschriebene Methode der Nitratreduktion, deren Verlauf in quantitativer Hinsicht leicht verfolgt werden kann.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt:

200 g Leber (Kalb) wurden in der Hackmaschine zerkleinert, der entstandene Brei wurde mit 400 ccm Wasser angerührt, zum Kochen erhitzt und filtriert. Von dem Filtrat wurden je 50 ccm mit 50 ccm frischer Kuhmilch und 5 g Natriumnitrat, mit oder ohne Zusatz von 2 g Natriumfluorid und 1 g Natriumbicarbonat, bei 50° zusammengebracht und die entstandenen Nitritmengen in der angegebenen Weise bestimmt. Der Zweck des Natriumbicarbonatzusatzes war die Ermittlung des Einflusses der Acidität<sup>2)</sup> bzw. der Alkalinität des Reaktionsgemisches auf den Verlauf der Nitratreduktion, während das zugesetzte Natriumfluorid die eventuelle Entwicklung von Bakterien auf dem für diese so geeigneten Kulturboden verhindern sollte. Die dabei erhaltenen Resultate sind in nachstehender Tabelle angeführt.

50 ccm Milch, 50 ccm Leberextrakt, 5 g Natriumnitrat, mit oder ohne Zusatz von 2 g Natriumbicarbonat und 2 g Natriumfluorid.

mg  $N_2O_3$  in 100 ccm.

Zeit in Stunden	Zusätze			
	—	$NaHCO_3$	$NaF$	$NaHCO_3 + NaF$
0,5	8,452	8,192	8,093	8,107
1	9,132	8,625	8,132	8,006
2	9,409	8,601	7,762	7,510
3	10,088	9,240	7,401	6,521
6	10,350	9,180	6,469	5,083
24	48,762	236,905	6,445	4,906

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß während der ersten Phasen des Reduktionsprozesses die Perhydridasewirkung keine beträchtlichen Unterschiede unter den eingehaltenen Bedingungen aufwies. Die weitere Nitratreduktion verlief aber je nach den Zusätzen verschieden. In Abwesenheit von Natriumfluorid (2. und 3. Spalte) fand ein stetiges Anwachsen der Nitritmenge statt, wobei der Endzustand klar auf eine Bakterienwirkung hindeutete. Daß in Anwesenheit von  $NaHCO_3$  die Nitritmenge 236,905 mg  $N_2O_3$  in Abwesenheit von  $NaHCO_3$  nur 48,762 mg betrug, erklärt sich durch den fördernden Einfluß der Alkalinität und durch den hemmenden Einfluß der Acidität auf die Entwicklung der Bakterien. In Gegenwart von  $NaF$  (4. und 5. Spalte) erreichte die Nitritmenge schon nach einer halben Stunde ihren maximalen Wert und nahm dann weiter regelmäßig ab. Be-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 33, 282, 1911.

<sup>2)</sup> Der gekochte Leberextrakt reagierte deutlich sauer.

merkwürdig ist hier, daß der Rückgang der Nitritmenge durch die Alkalinität des Reaktionsgemisches nicht verhindert, sondern sogar beschleunigt wird. Besonders klar tritt diese Tatsache in folgendem Versuch zum Vorschein:

50 ccm Milch, 50 ccm in der obigen Weise dargestelltes Extrakt aus Muskeln (Kalb), 2 g Natriumfluorid, mit oder ohne Zusatz von 1 g Natriumbicarbonat. Temperatur 50°.

mg  $N_2O_2$  in 100 ccm.

Stunden	0,5	1	2	3	6	24
Ohne $NaHCO_3$ -Zusatz	13,525	12,992	12,957	12,930	12,128	11,088
Mit $NaHCO_3$ -Zusatz	13,041	9,891	9,681	8,632	8,086	6,150

Der Rückgang der Nitritmenge betrug also in ersterem Falle 17,7%, in letzterem 53%. Wahrscheinlich wirkt die Alkalinität des Reaktionsgemisches auf die weitere Reduktion der entstandenen Nitrite fördernd. Darüber sollen weitere Versuche Aufschluß geben.

Die für die obigen Versuche angewandten Gewebe wurden mehrere Stunden nach dem Tode der Tiere auf Extrakte verarbeitet. Es fragt sich nun, ob das aufgefundenen Koferment bereits in den lebenden Geweben existiert oder erst bei der postmortalen Autolyse derselben entsteht. Zur Entscheidung der Frage wurde ein Kaninchen geopfert und seine Gewebe wurden sofort nach dem Tode auf das Koferment der Perhydridase geprüft. Der Erfolg war ein klar positiver. Um Aufschlüsse über die quantitative Verteilung des Kofermentes in verschiedenen Organen zu gewinnen, wurden von dem Schlachthofe bezogene, noch warme Kalbsgewebe in der oben angegebenen Weise auf Extrakte verarbeitet und untersucht. Sämtliche Versuche wurden gleichzeitig und unter sonst gleichen Bedingungen ausgeführt. In folgender Tabelle sind die dabei erhaltenen Resultate zusammengestellt.

50 ccm Milch, 50 ccm Extrakt, 5 g Natriumnitrat, 2 g Natriumfluorid. Temperatur 50°.

mg  $N_2O_2$  in 100 ccm.

Zeit in Stunden	Lunge	Gehirn	Milz	Niere	Leber
0,5	7,198	8,625	11,088	12,937	16,180
1	6,881	8,257	10,211	12,950	16,219
2	6,734	7,762	9,026	12,621	12,939
6	5,093	7,510	8,923	9,023	11,089
24	3,987	7,102	7,601	7,915	9,703

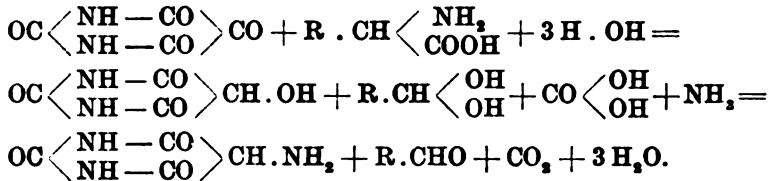
Demnach scheint die Leber das an Koferment reichste, die Lunge das ärmste Gewebe zu sein. Man muß aber nicht außer acht lassen, daß neben der Nitritbildung in sämtlichen Versuchen auch eine Nitritzerstörung stattfindet, und daß gerade in dem Lungenextrakt der schnellste Rückgang der Nitritmenge zu beobachten ist (55 %). Die erhaltenen Zahlen drücken also nur das jeweilige Resultat zweier in entgegengesetzten Richtungen gleichzeitig sich vollziehenden Prozesse aus. Absolute Werte werden sich nur dann erhalten lassen, wenn es gelingen wird, die hier in Betracht kommenden Prozesse getrennt voneinander zu verfolgen.

Wie eingangs erwähnt, ist das Koferment der Perhydridase kochbeständig. Es ist durch Alkohol nicht fällbar, dialysiert leicht und wird durch Behandeln mit einem Luftstrom nicht zerstört. Betreffs seiner chemischen Natur kann ich noch nichts Bestimmtes aussagen. Nach den bisherigen Erfahrungen ist als feststehend anzusehen, daß die Perhydridase nur Aldehyde, und zwar am besten die niederen Aldehyde der Fettreihe für Reduktionsprozesse verwerten kann. Auf Aldo hexosen ist sie ohne Einwirkung. Von Aldehydsäuren ist nur die Glyoxylsäure verwertbar. Da letztere in Form ihres Diureids, des Allantoins, im Tierkörper weit verbreitet ist, stellte ich einen Reduktionsversuch mit dieser Substanz an (50 ccm Milch, 5 g Natriumnitrat, 2 g Natriumfluorid, 1 g Allantoin in 100 ccm bei 50°). Der Versuch ergab ein völlig negatives Resultat. Unter den von mir eingehaltenen Versuchsbedingungen läßt sich also Allantoin in Glyoxylsäure und Harnstoff nicht spalten.

Im Zusammenhang mit der Frage nach der Natur des Kofermentes der Perhydridase sei hervorgehoben, daß der Tierkörper eine ständige und reichliche Aldehydquelle in den  $\alpha$ -Aminosäuren, die als normale Abbauprodukte der Proteine auftreten, besitzt.

Vor 50 Jahren machte A. Strecker<sup>1)</sup> die Beobachtung, daß  $\alpha$ -Aminosäuren schon bei gewöhnlicher Temperatur durch Alloxan unter Abspaltung von Ammoniak und Kohlensäure zu den Aldehyden der nächst niederen Kohlenstoffreihe oxydiert werden, wobei es selbst zu Uramil reduziert wird:

<sup>1)</sup> Notiz über eine eigentümliche Oxydation durch Alloxan. Ann. 123, 363, 1862.



Das entstandene Uramil kondensiert sich weiter mit unverändertem Alloxan zu Murexid.

Von W. Traube<sup>1)</sup> ist jüngst bewiesen worden, daß die gleiche Oxydation der  $\alpha$ -Aminosäuren auch durch andere Ketoverbindungen hervorgebracht werden kann. Es ist daher kaum zu bezweifeln, daß ähnliche Reaktionen sich auch im Tierkörper abspielen und zur Bildung von Aldehyden führen, die als Koferment der Perhydridase fungieren, indem sie weiter auf Kosten des Wassers zu den entsprechenden Säuren oxydiert werden.

Merkwürdigerweise ist die für das Verständnis der biologischen Abbauprozesse so wichtige Streckersche Reaktion von den Biochemikern völlig unbeachtet geblieben. Über seinen Befund äußert sich Strecker folgenderweise:

„Es scheint mir höchst merkwürdig, daß diese so beständigen Körper, wie Alanin und Leucin, durch das Alloxan so leicht oxydiert werden.“

Erst vor kurzem wurde von Hurtley und Wootton<sup>2)</sup> die Ansicht ausgesprochen, daß die Streckersche Reaktion in mehrfacher Hinsicht von biologischem Interesse sein dürfte. Berücksichtigt man nun die in den letzten Jahren bei der Erforschung der biologischen Abbauprozesse gemachten Erfahrungen, so erhält man den klaren Eindruck, daß diese Reaktion den Weg zeigt, auf dem der normale Abbau der Aminosäuren im Organismus sich vollzieht. Allem Anschein nach liegen derartige Reaktionen der Wirkung der desamidierenden Enzyme sowie der der Karboxylasen<sup>3)</sup> zugrunde. Es wäre daher von großem Interesse, die Beeinflussung der Streckerschen Reaktion durch katalytische Agentien zu erforschen.

<sup>1)</sup> Ber. 44, 3145, 1911.

<sup>2)</sup> Journ. chem. Society 288, 99, 1911.

<sup>3)</sup> Vgl. C. Neuberg, Ber. 44, 2477; diese Zeitschr. 31, 170; 32, 323, 1911.



## Zur Frage der individuellen Verschiedenheit der Blutkörperchen.

Von  
Ludwig Dienes.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 17. November 1911.)

In einer Kritik meiner Arbeit über die individuellen Verschiedenheiten der Blutkörperchen gelangt H. St. Rusznyák zu dem Schlusse, daß die mitgeteilten experimentellen Daten gegen die Annahme der individuellen Verschiedenheit und für einen allmählichen und gleichmäßigen Austritt des Hämoglobins sprechen. Dazu möchte ich folgendes bemerken:

1. Auf Seite 271 meiner Arbeit habe ich gesagt, was ja übrigens jedem unbefangenen Leser nach einmaligem konkreten Durchdenken des fraglichen Prozesses klar sein wird, daß den Versuchen nur in dem Falle eine Beweiskraft zukommt, wenn sie positiv ausfallen, d. h. wenn der Quotient  $\frac{\text{Hämoglobin}}{\text{Gesamtrest}}$  konstant bleibt. Die Veränderlichkeit des Quotienten spricht ebensowenig gegen als für eine individuelle Verschiedenheit der Blutkörperchen. Es müßte sich z. B. der Quotient entsprechend den berechneten Werten ändern, wenn zwar die Blutkörperchen nacheinander zugrunde gehen, die Stromata aber durch Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung nicht entfernt werden.

2. Die lediglich zur Vereinfachung der Berechnungen gemachte Annahme, daß die Blutkörperchen 50% Hämoglobin enthalten, hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Resultate. Sie spielt nur bei jenen Rechnungen eine Rolle, die zur Beurteilung der Schwankungen jener Werte dienen sollen, die als konstant betrachtet, in Wirklichkeit aber keine vollständige, hier und da sogar eine nicht befriedigende Konstanz aufweisen. Die Rechnung zeigt, daß ein Gehalt von 77% Hämoglobin nicht ohne weiteres angenommen werden kann, da man auf diese Weise zu paradoxen Resultaten gelangt. Wenn wir nämlich 77% Hämoglobin als Rechnungsbasis benutzen, so ergibt sich aus den Versuchen Nr. 4 und 7 (in geringerem Grade auch aus Versuch Nr. 2), daß der hämoglobinfreie Rückstand der Blutkörperchen während der Hämolyse und des

Auswaschens eine Gewichtszunahme erfahren hätten. Man würde nämlich zu dieser Annahme gezwungen durch den Umstand, daß die auf die angegebene Weise berechneten Werte höher ausfallen als die gefundenen. Dieses ließe sich aber nur durch die Annahme erklären, daß die Blutkörperchen Kochsalz in größerer Menge, 3 bis 5%, aufgenommen haben, was durchaus nicht wahrscheinlich ist, oder zumindest erst erwiesen werden müßte.

3. Die Behauptung von Ruzsnyák, daß die Unterschiede zwischen den gefundenen und den berechneten Werten des Quotienten von Versuchsfehlern herrühre, muß ich entschieden zurückweisen, und zwar aus folgenden Gründen. Zunächst habe ich die Größe der Versuchsfehler selbst bestimmt und angegeben, wie das bei jeder exakten Arbeit selbstverständlich ist. Dann verhalten sich die Quotienten in den verschiedenen Versuchsreihen, auch in den nicht mitgeteilten, so konstant, daß von gewöhnlichen Versuchsfehlern nicht die Rede sein kann. Zur Annahme systematisch wiederkehrender Versuchsfehler liegt aber kein Grund vor. Selbst wenn wir auch annehmen, daß die größten von mir angegebenen Fehler zusammenfallen, würden die zwei Werte (die berechneten und gefundenen) des Quotienten nicht übereinstimmen. So sind z. B. die beiden Werte im Versuch Nr. 8 0,715 und 0,695, d. h. bei 30% Hämoglobinverlust sind selbst bei dieser Art der Berechnung 11% der hämoglobinfreien Bestandteile der Blutkörperchen in Lösung gegangen (Ruzsnyák berechnet 17%).

4. Der Zweck, der uns zur Ausführung und Mitteilung unserer Versuche veranlaßt hat, war der, darauf hinzuweisen, daß der zeitliche Verlauf der Hämolyse eine Erklärung zuläßt, die nicht chemisch oder physikalisch, sondern biologisch ist; eine Erklärung, die an sich ebenso wahrscheinlich ist als alle anderen, und für die auch gewisse, wenn auch nicht durchaus zwingende Beweise angeführt werden können.

Wie hoch man die Beweiskraft unserer Versuche einschätzen will, darüber scheint uns jede Diskussion überflüssig. So viel geht aber aus unseren Versuchen mit voller Sicherheit hervor, daß die Blutkörperchen bei der Wasserhämolyse das Hämoglobin nicht ohne Verlust der übrigen Bestandteile abgeben, daß sie vielmehr schon bei geringeren Graden der Hämolyse (20 bis 30%) einen wesentlichen Teil der Strombestandteile verlieren, daß also von einer gleichmäßigen Hämoglobinabgabe — wie sie Ruzsnyák annimmt — nicht die Rede sein kann.

---

Bemerkungen zu der Arbeit von Julius Katz:

Über die Ausscheidung des Chinins beim Hunde  
und über eine neue Methode der quantitativen  
Chininbestimmung.

(Diese Zeitschr. 36, 144, 1911.)

Von

G. Giemsa, Hamburg.

(Eingegangen am 18. November 1911.)

In dem einleitenden Teil der Arbeit macht der Autor eine Reihe von Forschern namhaft, die sich mit dem Studium der Resorption und der Ausscheidung des Chinins beim Menschen beschäftigt bzw. die den Nachweis erbracht haben, daß das nach Chiningaben mit dem Harn ausgeschiedene Alkaloid „unverändertes“ Chinin sei. Die letzte Frage betreffend findet sich auf S. 145 folgender Passus: „Es ist daher Schmitz' Verdienst, diesen Nachweis zum ersten Male einwandfrei erbracht zu haben, indem er von dem isolierten Chinin das Sulfat und Chlorplatinat darstellte und analysierte und nach der völligen Reinigung auch den Schmelzpunkt des freien Chinins bestimmte. Nach ihm haben noch Großer im Jahre 1908 und Nishi im Jahre 1909 dieselbe Frage behandelt und in demselben Sinne beantwortet.“

Die Auffassung, daß die diesbezüglichen, im Mai 1907 veröffentlichten Untersuchungen von Schmitz, bei denen, wie letzterer selbst berichtet, die Metallbestimmung des Alkaloidplatinats verunglückte, als absolut einwandfreier Beweis für die Identität der in Frage kommenden Körper anzusehen sind, kann ich nicht ganz teilen, ich bin vielmehr der Ansicht, daß ein solcher erst durch eine gleichfalls 1907 erschienene, von mir<sup>1)</sup> in Gemeinschaft mit Schaumann verfaßte Arbeit erbracht wurde. Aus dieser geht hervor, daß wir uns nicht mit Krystallwasser-, Schmelzpunktsbestimmungen usw. begnügten, sondern daß wir vor allem (S. 60) eine vollständige „Elementaranalyse“ des fraglichen Körpers vorgenommen

---

<sup>1)</sup> G. Giemsa und H. Schaumann, Pharmakologische und chemisch-physikalische Studien über Chinin. Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1907, Beiheft 3.

haben, durch die dessen Identität mit Chinin erst endgültig bewiesen wurde. Elementaranalysen dementprechender menschlicher Harnausscheidungsprodukte sind meines Wissens weder vor noch nach uns ausgeführt worden. Auch in der Abhandlung von Katz, die Versuche mit Hunden zum Gegenstand hat, vermisse ich eine solche. Allein schon aus diesen Gründen glaube ich meiner Verwunderung darüber Ausdruck verleihen zu dürfen, daß unsere Arbeit vom Autor gar nicht zitiert wird.

Im weiteren Verlauf seiner Abhandlung (S. 153) beschreibt Katz eine neue „Ammoniumsulfatmethode“, die er dort zur Anwendung empfiehlt, wo es sich darum handelt, aus eiweißhaltigen oder schleimigen wässerigen Flüssigkeiten, die zur Emulsionsbildung neigen, irgendwelche Substanzen mit Äther, Chloroform u. dgl. auszuschütteln. Ich erwähne hierzu, daß ich<sup>1)</sup> bereits im Januar d. J. eine gleiche oder zum mindesten ganz ähnliche Ammoniumsulfatmethode für den qualitativen Chininnachweis in einer ganz besonders stark zur Emulsionsbildung neigenden Flüssigkeit, nämlich in der Milch, angegeben habe. Daß ich auch an eine Verwendbarkeit des dort beschriebenen Ausschüttungsverfahrens für die „quantitative“ Chininbestimmung dachte, geht aus dem auf S. 9 befindlichen Passus hervor: „Fügt man so viel Chinin zu, daß die Lösung des Chinins in Milch stärker ist als 1:10000, so scheidet sich mitunter ein Teil des Alkaloids beim Erkalten der Lösung krystallinisch ab, was bei einer ev. Verwertung der Methode für den quantitativen Chininnachweis zu berücksichtigen ist.“ Die geringen Änderungen, die das Katzsche Ausschüttungsverfahren dem von mir angegebenen gegenüber aufweist, und die in der Hauptsache in einem etwas geringeren Zusatz von Ammonsulfat bestehen, treffen den Kern der Sache keineswegs, und die vom Autor erwähnte Verallgemeinerung des Verfahrens betrachte ich als etwas so Selbstverständliches, daß ich darin kaum etwas Neues zu erblicken vermag.

Ich will zugeben, daß dem Autor diese kurze Publikation entgangen sein kann, da sie in einer Zeitschrift erschienen ist, die ein etwas abliegendes Spezialgebiet behandelt. Um so unverständlicher bleibt mir das Übergehen der unter Note 1 vor. Seite genannten Veröffentlichung, da in den vom Autor zitierten Arbeiten von Nishi und Großer, deren Ergebnisse von Katz verschiedentlich besprochen werden, zum Teil in ausführlicher Weise, von Großer sogar zu wiederholten Malen, auf die betreffende Publikation hingewiesen ist.

<sup>1)</sup> G. Giemes, Wird eingenommenes Chinin mit der Muttermilch ausgeschieden? Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 15, 8, 1911.

## Bemerkungen zur Haupt- und akzessorischen Atmung.

Von

F. Battelli und L. Stern.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Genf.)

(Eingegangen am 23. November 1911.)

Auf Grund sehr zahlreicher Untersuchungen sind wir zur Schlußfolgerung gelangt, daß in mehreren Tiergeweben zwei ganz verschiedene Atmungsprozesse existieren: die Hauptatmung und die akzessorische Atmung. Die erstere scheint an das Leben der Zelle gebunden zu sein und verschwindet mehr oder weniger schnell nach dem Tode des Tieres, während die letztere einen enzymatischen Charakter aufweist, ziemlich lange Zeit nach dem Tode konstant bleibt und in Abwesenheit von Zellelementen sich vollziehen kann.

In der Hauptatmung unterscheiden wir zwei Hauptagenzien: den fundamentalen Atmungsprozeß, der an die unlöslichen Zellbestandteile gebunden ist, und das Pnein, eine wasserlösliche hitzebeständige Substanz. Zusatz von Pnein zu einem Gewebe, dessen Atmungstätigkeit nach dem Tode des Tieres vermindert ist, steigert den Gaswechsel desselben bedeutend. Noch bessere Resultate erzielt man, wenn das Pnein zum vorher mit Wasser ausgewaschenen Muskel hinzugesetzt wird.

Unter den vielen Arbeiten, die wir über diesen Gegenstand veröffentlicht haben, wollen wir hier nur auf die zwei in dieser Zeitschrift erschienenen hinweisen<sup>1)</sup>, die die wichtigsten Resultate sowie die angewandte Methode enthalten.

In einer jüngst erschienenen Arbeit berichten Harden und

---

<sup>1)</sup> Battelli und Stern, Die akzessorische Atmung in den Tiergeweben: Diese Zeitschr. 21, 487, 1910. — Dieselben, Zur Kenntnis des Pneins. Diese Zeitschr. 33, 315, 1911.

Maclean<sup>1)</sup> über Versuche, die sie an den isolierten Geweben verschiedener Warmblüter ausgeführt haben. Unter den von ihnen erzielten Resultaten sind einige eine Bestätigung der von uns vor langer Zeit mitgeteilten. So z. B. die Aktivierung des Gaswechsels der Muskeln bei Verwendung von Blut an Stelle der physiologischen Kochsalzlösung; die Wirkungslosigkeit von Glykogen, Glucose, Milchsäure auf die Atmungstätigkeit usw. Wir wollen darauf hier nicht weiter eingehen.

Harden und Maclean sind hingegen in den wichtigsten Punkten mit unseren Untersuchungen nicht einverstanden und unterziehen dieselben einer scharfen Kritik, auf die wir hier so kurz wie möglich antworten wollen.

Die genannten Autoren finden unsere Methode wenig präzise und die von uns gemachte Beschreibung des Versuchsapparates mangelhaft. Diese Bemerkung ist höchst verwunderlich. In der Tat besteht der Apparat aus einer Schüttelmaschine, auf der mehrere Flaschen befestigt sind. Wir haben einen sehr bequemen Schüttelapparat beschrieben, aber man kann selbstverständlich einen beliebigen Schüttelapparat verwenden. Die Hauptsache ist, daß das Schütteln energisch genug sei, um den Kontakt des Gewebes mit dem Sauerstoff zu verstärken. Die Messung des aufgenommenen Sauerstoffs und der entwickelten Kohlensäure haben wir nach den üblichen Methoden ausgeführt. Die Schüler unseres Laboratoriums wiederholen jedes Jahr diese Versuche ohne die geringste Schwierigkeit.

Harden und Maclean sprechen die Ansicht aus, daß in unseren Versuchen über die akzessorische Atmung die Bakterien eine ausschlaggebende Rolle spielen, weil die Gewebe einige Stunden nach dem Tode des Tieres entnommen wurden. Diese Ansicht ist aber ohne ernstliche Berechtigung. In der Mehrzahl unserer Versuche entnahmen wir die Leber, Niere, Milz usw. zwei Stunden nach dem Tode des Tieres. Das aus dem Körper herausgeschnittene Organ wurde sogleich zum Versuche verwandt. Die Atmung des betreffenden Organs beginnt sofort und bleibt ungefährl eine halbe Stunde lang konstant, darauf nimmt sie allmählich ab und wird nach einer Stunde sehr schwach. Wie sollte man unter diesen Umständen noch von

<sup>1)</sup> Harden und Maclean, The oxidation of isolated animal tissues. Journ. of Physiol. 43, 34, 1911.

Bakterien sprechen können? Ubrigens wird die Annahme einer Bakterienwirkung auch dadurch widerlegt, daß das Temperatur-optimum für die akzessorische Atmung, ebenso wie für die verschiedenen Oxydationsfermente tierischen Ursprungs, bei 55° liegt. Wir halten es für überflüssig, diesen Punkt noch länger zu diskutieren.

Harden und Maclean haben eine Aktivierung des Gaswechsels der Gewebe durch Zusatz von Pnein nicht erzielen können. Zu ihren diesbezüglichen Versuchen benutzten diese Forscher die Leber mehrerer Tiere, und zwar einige Stunden nach dem Tode. Wir haben aber gerade darauf aufmerksam gemacht, daß die Lebern einige Stunden nach dem Tode die Hauptatmung verliert und nur die akzessorische oder fermentative Atmung aufweist, die durch Pnein nicht im geringsten beeinflußt wird. Wir haben außerdem mehrfach hervorgehoben, daß der Muskel des Kaninchens ein sehr schlechtes Reagens für das Studium der Pneinwirkung vorstellt.

Andererseits gelingt es Harden und Maclean nicht, den Gaswechsel des Muskelrückstandes der Taube durch Zusatz von Muskelextrakt (Pnein) zu aktivieren. Nun haben wir in Hunderten von Versuchen eine bedeutende Aktivierung des Muskelrückstandes der Taube, des Pferdes, des Rindes usw. regelmäßig erzielt. Alle Schüler unseres Laboratoriums führen jährlich diese Versuche aus und stets mit positivem Resultat. Wir haben auch auf dem Physiologenkongreß zu Heidelberg diesen Versuch demonstriert. Es ist wahrscheinlich, daß die negativen Resultate von Harden und Maclean auf die von ihnen benutzte Methode zurückzuführen seien, die darin besteht, einen Sauerstoffstrom durch das Reaktionsgemisch zu leiten. Die mit dieser Methode von den Autoren erzielten Werte sind 5 bis 6 mal niedriger, als die von uns beim Schütteln der Gewebeemulsionen erhaltenen.

Wenn die Herren Harden und Maclean die von uns in unseren Arbeiten in allen Einzelheiten angegebenen Versuchsbedingungen berücksichtigen wollten, würden sie dieselben Resultate erhalten wie wir.

Wir halten an allen Schlußfolgerungen fest, zu denen wir bisher gelangt sind, und speziell an denen, die sich auf die akzessorische Atmung, die Hauptatmung und das Pnein beziehen.

---

## Über die Verteilung der reduzierenden Stoffe im Blute.

Erwiderung an L. Michaelis und P. Rona.

Von

Ivar Bang.

(Eingegangen am 6. Dezember 1911.)

Zwei Auffassungen über die Verteilung des Zuckers im Säugetierblut stehen jetzt scharf einander gegenüber. Michaelis und Rona, denen sich Hollinger, Lépine, Frank mit Moeckel und Bretschneider anschließen bzw. dieselbe Auffassung unabhängig verteidigen, nehmen an, daß der Zucker zwischen Plasma und Blutkörperchen verteilt ist. Andererseits haben ich und meine Schüler gefunden, daß der Zucker nur im Plasma vorkommt, während die Körperchen andere reduzierende Körper enthalten. Wenn also Hollinger und Frank etwa dieselbe Totalreduktion für Plasma und Gesamtblut finden, ist dies gar nicht als ein Beweis gegen unsere Auffassung anzuführen, wie es Michaelis und Rona in ihrer Erwiderung<sup>1)</sup> getan haben.

Wenn aber Frank und Bretschneider bei Reduktion nach Vergärung für das Gesamtblut keine Reduktion nach Bertrand mehr erhalten, fragt es sich, inwieweit nicht bei der Gärung Stoffe gebildet worden sind, die den Niederschlag von Oxydul hindern bzw. inwieweit nicht eine eventuelle minimale Oxydulbildung bei der Luftoxydation während des Kochens, Abkühlung, Filtration und Auswaschens des Niederschlages in Lösung gegangen ist. In Takahashis<sup>2)</sup> Bestimmungen sind nicht die verwendeten Blutmengen angegeben und also auch nicht die absoluten Zuckerwerte. Seine Befunde sind also schwer zu beurteilen.

Gegen M.s und R.s Auffassung sprechen aber ihre eigenen Befunde, indem sie bald Zucker in den Körperchen gefunden haben, bald denselben vermissen. Wenn nun aber Rona und Döblin gefunden zu haben glauben, daß zugesetzter Zucker rasch in die Körperchen hineindiffundiert, und wenn doch das Plasma immer Zucker enthält, warum ist dann das Vorkommen von Zucker hier nicht konstant? Es ist auch sonderbar,

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 37, 47, 1911.

<sup>2)</sup> Ebenda 37, 30, 1911.



wenn diese Forscher, um ihre Befunde erklären zu können, die merkwürdige Hypothese heranziehen müssen, daß die Fibrinbildung etwas mit dem Blutzucker der Körperchen zu tun haben muß.

Es scheint mir aber recht unfruchtbar, weiter darüber zu streiten, welche Auffassung — die von M. und R., sowie von Frank usw., oder die von mir und meinen Schülern — die richtige ist. Die Sache läßt sich doch viel einfacher erledigen. Wenn M. und R. darin Recht haben, daß die Körperchen Traubenzucker enthalten, muß es ganz einfach sein, durch Darstellung des Glucosazons diesen Zucker direkt nachzuweisen.

Ich habe dies zwar vergebens versucht, doch sagt natürlich ein negativer Befund weniger, da M. und R. oft den Zucker vermissen. Es dürfte auch eine billige Forderung sein, daß eben die Forscher, welche die Gegenwart des Zuckers verteidigen, auch selbst den Nachweis bringen, wenn diese Qualität bestritten worden ist. Es ist aber klar, daß hierbei erst der Serumzucker vollständig entfernt und der Nachweis an rein dargestellten Blutkörperchen geliefert werden muß.

---

## Zur Bestimmung des Harnzuckers.

Von

Ivar Bang.

(Aus dem medicin.-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1911.)

Von verschiedenen Seiten darauf aufmerksam gemacht, daß bei der Entfärbung des Harns durch Blutkohle und Salzsäure nach Bohmannsson und mir auch Traubenzucker absorbiert wird, habe ich Nachprüfungen angestellt und die Richtigkeit dieses Einwandes bestätigt gefunden. Das von mir damals verwendete Präparat absorbierte aber keinen Zucker. Es hat sich herausgestellt, daß es ein etwa 20 Jahre altes Präparat unbekanntem Ursprungs war, das ich von dem hiesigen Apotheker bekommen hatte.

Die Mitteilung von A. C. Andersen<sup>1)</sup>, daß man mit gutem Erfolg die Salzsäure durch Essigsäure ersetzen kann, veranlaßt mich, kurz zu erwähnen, daß ich seit einiger Zeit mit gutem Erfolg die Salzsäure durch Alkohol ersetzt habe. Ich habe teils Mercks Präparate Blutkohle mit Salzsäure gereinigt (Nr. 1) und Blutkohle pro analysi (Nr. 2), teils Kahlbaums nicht mit HCl behandelte Blutkohle verwendet. Mercks Präparate sind die besten, besonders das Präparat pro analysi, sie nehmen auch mehr von den übrigen Harnbestandteilen auf. Mercks Präparate sind fein gepulvert, Kahlbaums nicht. Man setzt einen Teelöffel Blutkohle zu 18 ccm Harn + 2 ccm Alkohol von 95 bis 97%, schüttelt durch und filtriert gleich. Das Filtrat ist immer farblos. Durchschnittlich werden 60% der reduzierenden Stoffe hierdurch entfernt. Mehr als 0,5% Zucker darf der Harn jedoch nicht enthalten, sonst muß er zuerst verdünnt werden.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 37, 262, 1911.

# Untersuchungen über die innere Sekretion der Ovarien.

Von  
G. Schickele.

(Ausgeführt mit Unterstützung der Cunitz-Stiftung.)

## I.

### Das Vorkommen von gerinnungshemmenden Stoffen im weiblichen Genitalapparat und im Menstruationsblut.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut und der Frauenklinik der Universität Straßburg i. E.)

(Eingegangen am 29. November 1911.)

Es ist auffallend, daß das Menstruationsblut nur selten in den Bereich experimenteller Forschungen gezogen worden ist; dies gilt besonders für die sinnfälligste Eigenschaft dieses Blutes, für seine geringe Gerinnbarkeit.

Bis jetzt wurde angegeben — wenigstens in den Lehr- und Handbüchern (Fehling, Schaefer [Handb. der Gynäkologie] u. a.) —, daß der dem Blute beigemengte Cervixschleim die Gerinnung verhindert. Es war mir nicht möglich festzustellen, von wem diese Ansicht ausgeht, ebensowenig ob Versuche zur Begründung dieser Annahme existieren. In der letzten Zeit haben aber Birnbaum und Osten<sup>1)</sup> gezeigt, daß diese Deutung unrichtig ist, daß vielmehr der alkalische Cervixschleim die Gerinnung beschleunigt. Ich kann dies auf Grund von Versuchen, die mit der noch zu beschreibenden Methode ausgeführt worden sind, bestätigen. Die genannten Autoren glauben die Nichtgerinnbarkeit des Menstrualblutes auf eine Fermentverminderung im Blute zurückführen zu dürfen, ohne jedoch experimentelle Belege beizubringen.

Eine andere Ansicht vertritt Bell<sup>2)</sup>. Er glaubt nachgewiesen zu haben, daß der Kalkgehalt des Blutes während der Menstruation erhöht ist. Infolgedessen sei die Gerinnungsfähigkeit des Blutes vermindert; zur Erklärung der Uterusblutungen führt er dann in zweiter Linie lokale Veränderungen der Capillaren der Uterusschleimhaut an.

Cristea und Denk<sup>3)</sup> hingegen fanden den Kalkgehalt des Blutes während der Menstruation normal; sie sind der Ansicht, daß „die Eigenschaft, das Blut ungerinnbar zu machen, der Uterusschleimhaut zukommt.

<sup>1)</sup> Arch. für Gynäkologie 80.

<sup>2)</sup> Brit. med. Journ. 1907 und 1909.

<sup>3)</sup> Wiener klin. Wochenschr. 7, 1910.

die wahrscheinlich die Fähigkeit besitzt, Fibrinferment oder eine Vorstufe desselben zurückzuhalten oder unwirksam zu machen.“

In neuester Zeit haben sich Halban und Frankl<sup>1)</sup> mit der Ungerinnbarkeit des Menstrualblutes beschäftigt. Sie konnten in der Uterusmucosa ein proteolytisches Ferment nachweisen, und zwar ausnahmslos während des prämenstruellen Zeitraumes und meistens im Intervallstadium. Die menstruelle Blutung ist nach ihnen die Folge einer Andauung der Capillaren durch dieses Ferment und letzteres gleichzeitig die Ursache der Ungerinnbarkeit des Menstrualblutes.

Frankl und Aschner<sup>2)</sup> endlich weisen nach, daß der Uterusschleimhaut ein Reichtum an Trypsin zukommt, der im prämenstruellen Stadium bedeutend, im postmenstruellen Stadium unter physiologischen Verhältnissen gering, im Intervall wechselnd ist.

Damit ist die Zahl der Arbeiten erschöpft, die m. W. auf experimentellem Wege die Ungerinnbarkeit des Menstrualblutes zu erklären suchten. Die Ansichten sind, wie man sieht, recht widersprechend; es ließe sich höchstens als gemeinsames Ergebnis der Untersuchungen von Cristea-Denk und Halban-Frankl-Aschner hervorheben, daß der Uterusschleimhaut eine besondere Bedeutung für dieses eigentümliche Verhalten des Menstrualblutes zuzuschreiben ist.

## I.

### Versuche mit Preßsäften von menschlichen Organen.

Meine Versuche gingen von der sich mir bei pathologisch-histologischen Untersuchungen aufdrängenden Überzeugung aus, daß die bisherigen histologischen Befunde am Uterus weder für die normalen noch für die pathologischen Blutungen irgendeine befriedigende Erklärung geben können<sup>3)</sup>. Wie den zuletzt genannten Autoren, schien auch mir nur die Annahme übrig zu bleiben, daß chemische Ursachen innerhalb des Uterus oder der Ovarien bestehen müssen, deren Wirkung sich in der Ungerinnbarkeit des Menstruationsblutes äußert. Man konnte dabei ebenso an ein vermehrtes Auftreten eines gerinnungshemmenden Agens wie an die Verminderung von gerinnungsbeschleunigenden Substanzen denken. Beide Annahmen sind geeignet, den Übergang von den normalen zu den pathologischen Blutungen verständlich erscheinen zu lassen.

<sup>1)</sup> Gynäkol. Rundschau 1910.

<sup>2)</sup> Gynäkol. Rundschau 1911.

<sup>3)</sup> Vgl. Schickele und Keller, Die menstr. Veränderung der Uterusschleimhaut. Monatsschr. f. Geb. u. Gyn. 1911. — Die glanduläre Hyperplasie der Uterusschleimhaut u. ihre Bez. z. d. Uterusblutungen. — Die sog. chron. Metritis u. ihre Bez. z. d. Uterusblutungen. Arch. f. Gynäkologie 95, 3.

In Versuchen über die Blutgerinnung hatte sich in früheren Arbeiten aus dem hiesigen physiol.-chemischen Institut (Fuld, Spiro) das Blutplasma der Gans als sehr zweckmäßig erwiesen. Auf diese Technik ging ich zurück, nachdem sich in Vorversuchen die Verwendung von Pferdeblutfibrinogen als undurchführbar erwiesen hatte.

Dies Gänseblutplasma wurde in folgender Weise gewonnen: Nach Freilegung der Carotis wird in diese eine mit Paraffin ausgegossene Glas-kanüle eingeführt; das aus der Kanüle ausfließende Blut wird in ebenso paraffinierte Zentrifugiergläser von etwa 100 ccm Inhalt aufgefangen. Nach  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{3}{4}$  stündigem Zentrifugieren ist eine 2 bis 3 cm hohe klare Plasmaschicht vorhanden, die mit paraffinierter Pipette abgehoben und in ein paraffiniertes Reagensglas gebracht wird. Das so gewonnene Plasma bleibt, im Eisschrank aufbewahrt, längere Zeit ungeronnen; die Gerinnung tritt meist erst nach mehreren Tagen ein.

Von den zu untersuchenden Organen wurden auf Rat von Herrn Prof. Hofmeister Preßsäfte hergestellt: die Organe (menschliche Ovarien und Uteri, die durch Exstirpation gewonnen worden waren und dieselben vom Schlachthaus bezogenen Organe vom Rind, Pferd, Schaf usw.) werden in der Fleischhackmaschine zerkleinert, im Mörser unter Zusatz von viel Kieselgur und wenig Quarzsand energisch zerrieben. Es ist darauf zu achten, daß die Masse möglichst trocken wird; eventuell ist ein weiterer Zusatz von Kieselgur notwendig. Die so zubereitete Masse wird in der Buchnerschen Presse unter einem Druck von 400 bis 500 Atmosphären ausgepreßt, der Preßsaft zentrifugiert oder filtriert; er ist dann meist fast klar.

Zur Kontrolle der Ovarien- und Uterusversuche wurde anfangs Muskelpreßsaft verwendet, der in derselben Weise hergestellt worden war, wie eben beschrieben. Der erste Versuch gestaltete sich folgendermaßen:

Tabelle I.

Nr.	Gänseplasma	Physiol. Kochsalzlös.		Gerinnung
1.	2 ccm	2 ccm	2 ccm Preßsaft aus d. M. pector.(Gans)	nach 1 Min.
2.	2 „	2 „	2 ccm Uteruspreßsaft (Mensch)	nach 6 × 24 Std. nicht geronnen

Es wurde nun versucht, die Wirkung des Preßsaftes des Uterus gegen jene des Muskels abzustufen:

Tabelle II.

Nr.	Gänseplasma	Gänsemuskelpreßsaft	Uteruspreßsaft (menschl.)	Die Gerinnung trat ein nach
3.	2 ccm	2 ccm	2 ccm	4 Min.
4.	2 "	1 "	3 "	4 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "
5.	2 "	1 "	4 "	5 "
6.	2 "	1 "	5 "	7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "
7.	2 "	1 "	6 "	10 "

Aus diesem Versuche geht hervor, daß die gerinnungshemmende Wirkung des Uterus nicht so stark ist wie die gerinnungserregende des Muskels; daß sie aber wohl imstande ist, letztere auf einige Zeit zu verzögern.

Eine Bestätigung gab der zweite Versuch (Pat. De... vaginale Exstirpation des Uterus wegen profuser Blutungen):

Tabelle III.

Nr.	Gänseblut	Uteruspreßsaft			Gerinnung
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	—	tritt nicht ein (2 × 24 Std. beob.)
2.	15 "	Muskelpreßsaft 15 Tropfen	—	—	nach 5 Min.
	Gänseplasma	Gänsemuskelpreßsaft	physiol. Kochsalzlösung	Uteruspreßsaft	Gerinnung
3.	2 ccm	2 ccm	6 ccm	—	nach 5 Min.
4.	2 "	—	6 "	2 ccm	tritt nicht ein (2 × 24 Std. beob.)
5.	2 "	—	2 "	2 "	tritt nicht ein (2 × 24 Std. beob.)
6.	2 "	2 ccm	—	2 "	tritt nicht ein (2 × 24 Std. beob.)
7.	2 "	4 "	—	1 "	nach 3 Std. 12 Min.

Über die Wirkung von Organpreßsäften liegt eine ausführliche Untersuchung von Conradi<sup>1)</sup> aus dem hiesigen physiologisch chem. Institut vor. Danach erwiesen sich die Preßsäfte aus den frischen Organen verschiedener Säugetiere (Leber, Milz, Niere, Muskel, Lunge, Hirn, Hoden, Thymus, Rückenmark, Lymphdrüsen) als gerinnungsbeschleunigend (Ovarium und Uterus hat C. nicht untersucht). Die von mir beobachtete gerinnungshemmende Wirkung des Uteruspreßsaftes hatte sonach

<sup>1)</sup> Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 137.

etwas sehr Auffälliges. Dies konnte jedoch von der abweichenden Methodik herrühren. Conradi hatte die Wirksamkeit seiner Preßsäfte gegenüber Hunde- und Kaninchenblut geprüft, während ich mit Gänseplasma arbeitete. Es ergab sich darum die Notwendigkeit, die Wirkung von Preßsäften verschiedener Organe gegen letzteres zu prüfen.

Diese Preßsäfte wurden in ganz gleicher Weise gewonnen, wie oben beschrieben. Dabei ergab sich, daß bei meiner Versuchsanordnung — also gegenüber Gänseplasma — auch andere Organe eine Hemmungswirkung zeigten, wenn auch viel weniger ausgesprochen als das Ovarium, nämlich Schilddrüse, Thymus, Nebennieren und Hoden.

Ich führe folgende Versuchreihe an:

Tabelle IV.

Nr.	Gänseplasma	Preßsaft von	Phys. Kochsalzlösung	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	2 ccm	Gehirn (Mensch) 2 ccm	6 ccm	22 Min.
2.	2 „	Leber „ 2 „	6 „	56 „
3.	2 „	„ (Gans) 2 „	6 „	10 „
4.	2 „	Nieren (Mensch) 2 „	6 „	3 Std. 44 Min.
5.	2 „	Placenta „ 2 „	6 „	25 Min.
6.	2 „	Ovarium „ 2 „	6 „	Gerinnt nicht

In einem andern einschlägigen Versuch wurde an Stelle von Muskelpreßsaft Serum von Pferd- oder Rinderblut verwendet und in derselben Art wie oben Preßsaft von Drüsen mit innerer Sekretion untersucht.

Tabelle V.

Nr.	Gänseplasma	Blutserum	Preßsaft von	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	4 Min.
2.	15 „	15 „	Hoden (Stier) 15 Tropfen	38 „
3.	15 „	15 „	Thymus 15 „	6 St. 13 Min.
4.	15 „	15 „	Schilddrüse 15 „	14 St.
5.	15 „	15 „	Nebenniere 15 „	5 St. 40 Min.

} als Maximum mehrerer Versuche

In diesen Drüsen sind also gerinnungshemmende Substanzen vorhanden, ihre Wirkung ist aber wesentlich geringer als jene des Uterus und der Ovarien.

In dieser Richtung besteht anscheinend eine Verschiedenheit zwischen Gänseplasma und Kaninchenblut. Gänseplasma erscheint als das empfindlichere Reagens gegenüber den gerin-

nungshemmenden Substanzen. Mit Rücksicht auf die späteren Darlegungen sei gleich hier erwähnt, daß Ovarium- und Uteruspreßsaft auch gegenüber frischem Säugetierblut gerinnungshemmend wirken, daß ferner ihre intravenöse Injektion nicht, wie es bei Preßsäften anderer frischer Organe von Conradi beobachtet ist, Tod durch Thrombosierung, sondern eine mehr oder weniger merkliche, manchmal sehr ausgesprochene Verlangsamung der Gerinnung veranlassen.

In Hinblick auf die Beziehungen zur Menstruation habe ich die gerinnungshemmende Wirkung von Ovarien und Uterus zunächst beim Menschen, dann aber auch bei Tieren eingehender verfolgt. Auf Grund sehr zahlreicher Einzelversuche stellte sich mit der Zeit folgende Anordnung als die beste heraus: Um die gerinnungshemmende Wirkung des zu untersuchenden Preßsaftes festzustellen, wird von einem System Plasma + Pferde- oder Rinderblutserum zu gleichen Teilen ausgegangen, dessen Gerinnungszeit für jede einzelne Versuchsreihe zuvor bestimmt wird. Die gerinnungshemmende Wirkung des einzelnen Preßsaftes wird geprüft durch Zusetzen von 1, 3, 5 bis 15 Tropfen. Dabei wird nur dann Gerinnung angenommen, wenn die Probe derart erstarrt ist, daß man das Reagensgläschen stürzen kann, ohne daß der Inhalt ausläuft. Häufig genügte schon ein einziger Tropfen, um eine Verzögerung der Gerinnung zustande zu bringen. In vereinzelt Versuchen erschien bei Zusatz von nur einem Tropfen des Preßsaftes die Gerinnung im Vergleich zur Kontrolle um ein Weniges beschleunigt. Kleine Zeitunterschiede nach oben oder unten dürfen jedenfalls nicht hoch angeschlagen werden. Grundsätzlich habe ich nur größere Unterschiede (von etwa einer Stunde an) berücksichtigt. In manchen Fällen endlich tritt die hemmende Wirkung eines Preßsaftes erst nach Zusatz mehrerer Tropfen zutage.

Im Laufe der Versuche stellten sich vorübergehend unerwartete Schwierigkeiten ein; bei Mischung von Plasma und Preßsaft von Uterus und Ovarien in der bisherigen Weise traten starke Fällungen oder Trübungen oder beides gleichzeitig auf, so daß die Beobachtung des Gerinnungsvorganges sehr erschwert wurde. Es konnte dabei weder zu altes Plasma oder unsauberes Material im Spiele sein, da zu jeder neuen Versuchsreihe eine frische Gans entblutet und das Glas oder sonstige Material mit besonderer Sorgfalt (Paraffinieren, Auskochen, Trockensterilisation) hergerichtet wurde. Auch vorhergegangene geringe Mästung der Gänse (Zeit der Gänsestopfung!) war anscheinend



nicht zu beschuldigen. Diese Fällungen beruhen vielleicht auf der Anwesenheit eines dem Myosin nahestehenden Körpers, der hauptsächlich in dem Preßsaft des Uterus, weniger in jenem des Ovariums vorhanden ist (die diesbezüglichen Untersuchungen wurden von Herrn Prof. Hofmeister ausgeführt). Außerdem konnte die leicht saure Reaktion der Preßsäfte von Bedeutung sein. Deshalb wurden diese Säfte zuerst mit einigen Tropfen Natr. carbon. neutralisiert, dann zentrifugiert und nun die fast oder ganz klare abpipettierte Flüssigkeit zum Versuche genommen. Es zeigte sich aber, daß durch diese Vorbehandlung die anti-koagulierende Wirkung fast oder ganz aufgehoben war. Durch Dialyse der Preßsäfte wurde die früher beobachtete Wirkung bedeutend herabgesetzt oder ganz aufgehoben.

In späteren Versuchen stellten sich diese Störungen seltener ein, z. T. konnten sie umgangen werden; sobald aber größere Mengen eines Preßsaftes in Anwendung kamen, traten sie manchmal wieder auf. Merkwürdigerweise stellten sie sich bei denselben in späteren Semestern wiederholten Versuchen nicht mehr ein; sie müssen leider unaufgeklärt bleiben. Bemerkenswert ist noch, daß der Preßsaft des Ovariums viel seltener Trübung und Fällung verursachte als derjenige des Uterus. — Flüssigkeiten, welche nach 2 bis 4  $\times$  24 Stunden nicht geronnen, aber klar geblieben waren, fingen gelegentlich an, um diese Zeit sich zu trüben; dies war jedoch zeitlich sehr verschieden. Im Laufe der nächsten Stunden oder Tage nahm die Trübung zuweilen zu, so daß nachträglich mancher Versuch aus diesem Grunde unbrauchbar wurde.

Zur Veranschaulichung mögen einige Versuche folgen. Von der ausführlichen Mitteilung der einzelnen Fälle kann hier abgesehen werden, da die Fälle mehr klinisches Interesse besitzen.

Tabelle VI.

Uterus von Frau Her . . . , vaginale Totalexstirpation wegen Prolaps (die Ovarien stehen nicht zur Verfügung).

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Uteruspreßsaft	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	23 Min.
2.	15 „	15 „	1 Tropfen	44 Min. (sofort geringe Trübung und Bildung einiger Flocken)
3.	15 „	15 „	3 „	5 Std. 30 Min. (mäßige Trübung)
4.	15 „	15 „	5 „	6 Std. 30 Min. (stärkere Trübung)

Bei Zusatz von größeren Mengen Uteruspreßsaft treten sofort starke Fällungen und Trübungen auf. Es kommt zwar nicht zu einer gelatinösen Gerinnung, aber zur Ausscheidung so dicker Flocken, daß eine Verwertung der Versuche nicht mehr möglich ist.

Tabelle VII.

Frau Fe..., abdominale Totalexstirpation wegen Myomatosis uteri.  
Preßsäfte von Uterus und Ovarium.

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Uteruspreßsäft	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	17 Min.
2.	15 "	15 "	1 Tropfen	48 "
3.	15 "	15 "	3 "	54 "
4.	15 "	15 "	5 "	1 Std. 44 Min.
5.	15 "	15 "	7 "	3 " 2 "
6.	15 "	15 "	10 "	5 " 44 "
7.	15 "	15 "	15 "	16 " 36 "
			Ovariumpreßsäft	
8.	15 "	15 "	1 Tropfen	41 Min.
9.	15 "	15 "	3 "	1 Std. 16 Min.
10.	15 "	15 "	5 "	3 Std.
11.	15 "	15 "	7 "	10Std. ? schon früher?
12.	15 "	15 "	10 "	10 Std. 6 Min.
13.	15 "	15 "	15 "	Nach 3 × 24 Std. noch nicht geronnen

Trübungen oder Fällungen traten nicht auf.

Tabelle VIII.

Frau M..., supravaginale Amputation des Uterus und der Adnexa  
wegen Myomatosis uteri. Uterusschleimhaut und Muskulatur werden  
getrennt gepreßt.

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Preßsäft der Uterusmuskulatur	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	24 Min.
2.	15 "	15 "	1 Tropfen	37 "
3.	15 "	15 "	3 "	48 "
4.	15 "	15 "	5 "	2 Std. 29 Min.
5.	15 "	15 "	7 "	7 " 8 "
6.	15 "	15 "	10 "	15 " 23 "
			Preßsäft der hyperplastischen Uterus-Schleimhaut	
7.	15 "	15 "	1 Tropfen	29 Min.
8.	15 "	15 "	3 "	2 Std. 31 Min.
9.	15 "	15 "	5 "	41 " 45 "
			Preßsäft d. Ovarien	
10.	15 Tropfen	15 Tropfen	1 Tropfen	33 Min.
11.	15 "	15 "	3 "	4 Std. 10 Min.
12.	15 "	15 "	5 "	Nach 4 × 24 Std. leichte Trbg.; 26Std. später Gerinnung
13.	15 "	15 "	15 "	Nach 4 × 24 Std. Trübg. i. Laufe d. nächsten 2 × 24Std. keine Gerinnung, aber zunehm. Trübung

Weitere Versuche mußten aus Mangel an Material unterbleiben.

In diesem Versuche ist die starke hemmende Wirkung der Uterusschleimhaut bemerkenswert. Auch aus anderen Versuchen geht hervor, daß die Schleimhaut stets stärker wirkt als die Uterusmuskulatur, und zwar gilt dies besonders für die Fälle von starken Blutungen, wo aus diesem Grunde der Uterus exstirpiert worden war.

Dieselbe gerinnungshemmende Wirkung besitzen auch Preßsäfte von Myomen, von Tuben und von Corpora lutea; letztere wirken in derselben Intensität wie Preßsäfte der Ovarien überhaupt. Ich konnte nicht feststellen, daß die Wirkung des Corpus luteum-Preßsaftes im allgemeinen diejenige der Ovarien übertrifft, wenn auch zuweilen die Verzögerung sehr stark war. So z. B. war im Versuch vom 26. VII. 10 [Nr. 3: Plasma + Serum + Corpus luteum zu gleichen Teilen (15 Tropfen)] am 7. VIII. 10 die Gerinnung noch nicht eingetreten, während Plasma + Serum allein nach 20 Min. geronnen war. Während der Gravidität besitzen Preßsäfte von Uterus und Ovarien dieselbe gerinnungshemmende Wirkung.

Die Follikelflüssigkeit besitzt keine gerinnungshemmende Wirkung: Versuch vom 14. VI. 10, Nr. 7.

1. Plasma + Serum  $\bar{a}\bar{a}$ : . . . . . Gerinnung nach 4 Min.
2. „ + „ + Follikelflüssigkeit  
vom Rind: . . . „ „ 8 „

Für die menschliche Follikelflüssigkeit gilt dasselbe (das Material zu diesem Versuche stammte von einem haselnußgroßen sprungreifen Follikel, von einer pflaumengroßen „Follikelcyste“ und von einer walnußgroßen Ovarialcyste):

3. Plasma + Serum + Follikelinhalt  $\bar{a}\bar{a}$ : Gerinnung nach 4 Min.
4. „ + „ + Follikelcysteninhalte: „ „ 4 „
5. „ + „ + Ovarialcysteninhalte: „ „ 5 „

Ich möchte daraus den Schluß nicht ziehen, daß der Follikel als solcher an der Produktion der gerinnungshemmenden Substanz nicht beteiligt ist. Es kann vielmehr aus diesen und ähnlichen Versuchen nur gefolgert werden, daß eine hemmende Substanz in der Follikelflüssigkeit nicht vorhanden ist.

Die Preßsäfte sind immer leicht sauer. Durch Neutralisation und nachträgliches Filtrieren wird ihre hemmende Wirkung wesentlich vermindert.

Tabelle IX (24. I. 10).

1.	Plasma + Serum	ä:	. . . . .	Gering.	n. 23 Min.
2.	" + "	"	+ Uteruspreßsaft 1 Tr.:	"	" 37 "
3.	" + "	"	+ "	3 "	" 6 Std. 58 Min.
4.	" + "	"	+ "	5 "	Nach 7 × 24 Std. nicht geronnen
14.	" + "	"	+ "	neutralisiert mit Natr.-Carb.	1 Tr.: Gering. n. 18 Min.
15.	" + "	"	+ "	3 "	" 30 "
16.	" + "	"	+ "	5 "	" 45 "
17.	" + "	"	+ "	10 "	" 2 Std. 5 Min.

Durch Dialyse wird die hemmende Wirkung der Preßsäfte noch mehr als durch die Neutralisation beeinflusst.

Uteruspreßsaft wird in einem Schilfschlauch gegen physiologische Kochsalzlösung 24 Stunden dialysiert. Der Preßsaft ist nach dieser Zeit farblos und nur noch eine Spur sauer.

Tabelle X.

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Uteruspreßsaft	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	10 Min.
2.	15 "	15 "	1 Tropfen	2 Std. 31 Min.
3.	15 "	15 "	3 "	4 × 24 Std.
			Uteruspreßsaft n. 24stünd. Dialyse	
4.	15 "	15 "	5 Tropfen	20 Min.
5.	15 "	15 "	10 "	28 "
6.	15 "	15 "	15 "	25 "
7.	15 "	15 "	30 "	23 "

Die Außenflüssigkeit ist stark sauer, nicht trüb. Der Zusatz einiger Tropfen dieser Flüssigkeit zu dem System Plasma + Serum ruft sofort eine starke Trübung und Flockenbildung hervor. Solche Versuche können deshalb nicht weiter verwendet werden.

## Versuche mit Preßsäften von tierischen Organen.

Tabelle XI.

Uterus und Ovarien vom Rind.

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Uteruspreßsaft	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	23 Min.
2.	15 "	15 "	1 Tropfen	25 "
3.	15 "	15 "	3 "	13 Std. 26 Min. (einige Flocken)

Tabelle XI (Fortsetzung.)

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Uteruspreßsaft	Die Gerinnung tritt ein nach
4.	15 Tropfen	15 Tropfen	5 Tropfen	N.7 × 24 Std. unger., dann rasche Trübg.
5.	15 "	15 "	10 "	Sof. dick. Niederschl.
			Ovariumpreßsaft	
6.	15 "	15 "	1 Tropfen	33 Min.
7.	15 "	15 "	3 "	36 "
8.	15 "	15 "	5 "	6 Std. 28 Min.
9.	15 "	15 "	10 "	48 Std.
10.	15 "	15 "	15 "	4 × 24 Std., jed. nicht sehr deutl.; 12 Std. spät. völl. Fibrinolyse

Tabelle XII (31. I. 10).

Pferd (Uterus und Ovarien, Preßsäfte).

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Uteruspreßsaft	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	23 Min.
2.	15 "	15 "	1 Tropfen	33 "
3.	15 "	15 "	3 "	1 Std. 16 Min.
4.	15 "	15 "	5 "	4 " 40 "
5.	15 "	15 "	10 "	} Nach 7 × 24 Std. n. keine Gerinnung., aber zunehmende Trübg.
6.	15 "	15 "	15 "	
			Ovariumpreßsaft	
7.	15 "	15 "	1 Tropfen	37 Min.
8.	15 "	15 "	3 "	1 Std. 17 Min.
9.	15 "	15 "	5 "	6 " 46 "
10.	15 "	15 "	10 "	45 " 45 "
11.	15 "	15 "	15 "	Nach 48 St. beg. Trübung u. starker Niederschlag

Neutralisation und Filtern der leicht sauren Preßsäfte.

			Uterus (Neutr.)	
12.	15 Tropfen	15 Tropfen	1 Tropfen	24 Min.
13.	15 "	15 "	3 "	24 "
14.	15 "	15 "	5 "	34 "
15.	15 "	15 "	10 "	34 "
16.	15 "	15 "	15 "	1 Std. 28 Min.
			Ovarium (Neutr.)	
17.	15 "	15 "	1 Tropfen	26 Min.
18.	15 "	15 "	3 "	27 "
19.	15 "	15 "	5 "	27 "
20.	15 "	15 "	10 "	1 Std. 19 Min.
21.	15 "	15 "	15 "	2 " 56 "

Tabelle XIII (8. II. 10.).  
Schaf (Preßsäfte von Uterus und Ovarien).

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Uteruspreßsaft	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	26 Min.
2.	15 "	15 "	1 Tropfen	33 "
3.	15 "	15 "	3 "	3 Std. 53 Min
4.	15 "	15 "	5 "	15 Std.
5.	15 "	15 "	7 "	45 "
6.	15 "	15 "	10 "	} Zunehmende Trüb. nach d. erst. Tag. u. starke Niederschl.
7.	15 "	15 "	15 "	
			Ovariumpreßsaft	
8.	15 "	15 "	1 Tropfen	25 Min.
9.	15 "	15 "	3 "	50 "
10.	15 "	15 "	5 "	3 Std. 28 Min.
11.	15 "	15 "	7 "	6 " 11 "
12.	15 "	15 "	10 "	14 " 24 "
13.	15 "	15 "	15 "	Nach 4 × 24 Std. Ger. noch nicht eingetret.; rasch zunehm. Trübg.

Neutralisation und Filtrieren des sauren Uteruspreßsaftes,  
Zentrifugieren, Abpipettieren.

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Uterus (Neutr.)	Die Gerinnung tritt ein nach
14.	15 Tropfen	15 Tropfen	3 Tropfen	10 Min.
15.	15 "	15 "	5 "	18 "
16.	15 "	15 "	7 "	? jedenfalls weniger als eine Stunde
17.	15 "	15 "	10 "	1 Std. 9 Min.
18.	15 "	15 "	15 "	2 " 54 "

Alle Flüssigkeiten bleiben blau.

Tabelle XIV (15. II. 10.).  
Schwein (nur Ovarien, wenige Tropfen Preßsaft).

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Ovariumpreßsaft	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	17 Min.
2.	15 "	15 "	5 Tropfen	2 Std. 30 Min.
3.	15 "	15 "	10 "	} Nach 3 × 24 Std. keine Gerinn., be- ginnende Trübung, rasch zunehmend.
4.	15 "	15 "	15 "	

Tabelle XV.  
Hund (Uterus und Ovarien, Preßsaft).

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Uteruspreßsaft	Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	17 Min.
2.	15 "	15 "	3 Tropfen	46 "
3.	15 "	15 "	5 "	5 Std. 7 Min.
			Ovariumpreßsaft	
4.	15 "	15 "	3 Tropfen	26 Min.

Die Preßsäfte des Uterus und der Ovarien von Tieren besitzen dieselbe hemmende Eigenschaft wie diese Organe beim Menschen. Auch hier ist eine Parallele zwischen der Wirkung des Uterus und der Ovarien hervorzuheben. Das Verhältnis ist aber anders als beim Menschen: die gerinnungshemmende Wirkung übertrifft diejenige der Ovarien. Es ist mir leider nicht möglich gewesen, Organe von brünstigen Tieren zu erhalten.

### III.

#### Die Wirkung von wässerigen Organextrakten.

Die vorstehenden Versuche sind alle mit Preßsäften ausgeführt worden. Die Organe werden zerkleinert und unter hohem Druck ausgedrückt; auf diese Art läßt sich eine vollständige Zertrümmerung der einzelnen Zellen erzielen, so daß der ausgepreßte Saft wenigstens zum Teil als Zellflüssigkeit anzusehen ist.

Dieser Zellflüssigkeit kommt nun die erwähnte hemmende Wirkung zu, denn die Resultate werden ganz anders, wenn wir die Gewebe nicht auspressen, sondern nur einfach möglichst fein zerschneiden.

Die Ausführung der Versuche war folgende: Es wurde mit je 15 Tropfen Gänseplasma und Pferdeserum eine kleine Quantität zerschnittener Organteile vermischt. Es zeigte sich aber bald, daß der Zusatz von Serum zur Einleitung der Gerinnung gar nicht nötig ist, und deshalb wurden auch vielfach die zerschnittenen Organteile in Plasma allein (dann 1 ccm desselben) gebracht. Die Menge der zerschnittenen Organstückchen war immer möglichst gleich groß, etwa  $\frac{1}{3}$  Volumen eines Kubikzentimeters entsprechend.

Die Versuche der Tab. XVI, die einer größeren Anzahl entnommen sind, zeigen, daß feinzerschnittene Organteile (Ovarium, Uterus, Myom, Uterusschleimhaut, Corpus luteum) die Gerinnung befördern, und zwar oft in intensiverer Weise als das Pferdeserum allein. Daß es sich dabei nicht um eine Kontaktwirkung handelt wie bei feinzerteilten Substanzen, ließ sich schon daraus entnehmen, daß die Gerinnungsbeschleunigung nicht von der Innigkeit der Mischung oder der Größe der Oberfläche des eingebrachten Gewebes abhängig war. Wenn man z. B. mit einem gläsernen Objektträger die Schleimhaut eines exstirpierten Uterus abschabt, sie in physiol. Kochsalzlösung aufschwemmt und

mehrere Stunden auf Eis stellt, dann wird durch das so hergestellte Extrakt die Gerinnung wesentlich beschleunigt.

Tabelle XVI.

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum		Die Gerinnung tritt ein nach
1.	15 Tropfen	15 Tropfen	—	23 Min.
2.	15 „	15 „	Uterus (zerkleinert)	12 „
3.	15 „	15 „	Uterusschleimhaut (zerkleinert)	6 „
4.	15 „	15 „	Myom (zerkleinert)	13 „
5.	15 „	15 „	Ovarium „	61 „

Die Gerinnung kommt auch ohne Zusatz von Pferdeblutserum zustande.

	Gänseplasma		Die Gerinnung tritt ein nach
6.	1 ccm	—	15 $\frac{1}{2}$ Std.
7.	1 „	Ovarium (ein einz. Stk. = $\frac{1}{2}$ ccm)	20 Min.
8.	1 „	„ dasselbe (fein zerschnitt.)	20 „
9.	1 „	„ „ „ „ „ nur Marksubstanz)	22 „
10.	1 „	Corpus luteum desselben Ovarium, fein zerschnitten	11 „
11.	1 „	Ovarium (anderer Fall) Rindensubstanz (fein zerschnitten)	7 „
12.	1 „	Ovarium (dasselbe) Marksubstanz (fein zerschnitten)	5 „

#### Gerinnungsversuch vom 14. VI. 10:

1. Gänseplasma 15 Tropfen + Pferdeserum 15 Tropfen, gerinnt nach 4 Min.;

2. Gänseplasma 15 Tropfen + Pferdeserum 15 Tropfen + Uterusschleimhaut 15 Tropfen gerinnt nach 2 Min. (extrahiert wie eben beschrieben).

Dasselbe gilt für die entsprechend extrahierte Tubenschleimhaut; in dem analogen Versuche trat die Gerinnung nach 2 Min. ein.

Noch deutlicher geht das Fehlen einer Kontaktwirkung daraus hervor, daß nach Verreiben der zerkleinerten Organe im Mörser und nachfolgender Extraktion mit physiol. Kochsalzlösung dieselbe gerinnungsbeschleunigende Wirkung nachgewiesen werden kann.

Kochsalzextrakte zerkleinerter Ovarien und ebenso des Uterus unterscheiden sich somit in ihrer Gerinnungswirkung



nicht von anderen Organen; sie enthalten wie diese Thrombin oder Thrombokinase. Die Verschiedenheit in der Wirkung einfacher wässriger Extrakte und der Preßsäfte weist darauf hin, daß die gerinnungshemmende Substanz fester im Gewebe gebunden, vermutlich als endocellulärer Bestandteil vorhanden ist. Bei einfacher Zerkleinerung der Organe und Ausziehen mit Kochsalzlösung wird vor allem die in den Gewebelücken befindliche Flüssigkeit: Blut, Lymphe, Follikelinhalt ausgespült, daneben werden aus den Zellen nur leicht diffusible Stoffe übertreten. Das gerinnungserregende Agens dürfte den Blutresten und der Lymphe angehören. Bei der Preßsaftbereitung gehen aber infolge der Zertrümmerung der Zellen und des hohen Druckes auch kolloide, dem Protoplasma angehörige Stoffe, in die Flüssigkeit über. Da in den Preßsaft daneben auch Blutreste und Lymphe übergehen, so muß er beide antagonistisch wirkende Stoffe enthalten, jedoch beim Uterus und Ovarium in einem solchen Verhältnis, daß die Hemmungswirkung weitaus überwiegt. Da ein Teil der Hemmungswirkung zur Neutralisation der Gerinnungswirkung verbraucht wird, muß der Gehalt an Hemmungskörpern in den Preßsäften sogar größer sein, als sich aus der beobachteten Wirkung schließen läßt. Umgekehrt dürfte allerdings der Hemmungskörper auch den einfachen Extrakten nicht ganz fehlen, wenn seine Wirkung auch durch jene des Gerinnungskörpers verdeckt wird, worauf in der Tat einzelne Beobachtungen, namentlich mit Ovarialextrakten, hinweisen (vgl. Tab. XVI, 5).

Die sehr allgemeine Verbreitung von gerinnungsbefördernden Stoffen im Zellprotoplasma ist seit den Untersuchungen Alex. Schmidts und seiner Schüler, namentlich Rauschenbachs, ausreichend bekannt. Da die diesfälligen Versuche regelmäßig mit Säugetierblut ausgeführt worden sind, habe ich mich zum Überfluß von der durchaus ähnlichen Einwirkung auf Gänseplasma überzeugt.

1. Gänseplasma 1 ccm + Niere (Kaninchen, fein zerschnitten): Gerinnung nach 11 Min.;
2. Gänseplasma 1 ccm + Leber (Kaninchen, fein zerschnitten): Gerinnung nach 8 Min.;
3. Gänseplasma 1 ccm + Niere (Gans, fein zerschnitten): Gerinnung nach 4 Min.;

4. Gänseplasma 1 ccm + Leber (Gans, fein zerschnitten): Gerinnung nach 2 Min.;

5. Gänseplasma 1 ccm + Muskel (psoas Gans, fein zerschnitten): Gerinnung nach 26 Min.

Diese Beobachtungen entsprechen auch, wie oben erwähnt, dem von Conradi festgestellten Verhalten der meisten Organpreßsäfte. Um so bemerkenswerter erscheint das ausgesprochen entgegengesetzte Verhalten der Preßsäfte von Uterus und Ovarien. Wie bereits hervorgehoben, zeigen aber auch die Preßsäfte einiger anderer Organe eine wenn auch geringere Hemmungswirkung. Vielleicht kann dieses Verhalten zur Erklärung von Conradi's Beobachtung dienen, daß aseptisch und antiseptisch autolysierte Organe zumeist eine Hemmungswirkung äußern. Da bei der Autolyse die Zellstruktur durch Selbstverdauung zerstört wird, ist es verständlich, daß dabei die in den Zellen eingeschlossenen Hemmungskörper frei werden und in die Extrakte übergehen, wobei allerdings daran zu denken ist, daß die Hemmungskörper in den Organen, wo sie nicht direkt im frischen Preßsaft nachweisbar sind, durch den autolytischen Vorgang neu gebildet werden. Dabei kommt noch in Betracht, daß die Gerinnungsfermente beim Stehen ihre Wirksamkeit einbüßen können, wie dies für Blutserum bekannt ist. Aus den einschlägigen Versuchen von Conradi (S. 149 bis 151) geht übrigens bemerkenswerterweise hervor, daß das Rindsovarium nach der Autolyse mit größerer Sicherheit und Intensität die Gerinnung von Kaninchen- und Hundeblood aufhebt, als irgendein anderes autolysierendes Organ. Zufällig hat Conradi weder Preßsaft von frischen Ovarien und Uterus, noch auch autolysierten Uterus untersucht.

#### IV. Eigenschaften der gerinnungshemmenden Substanz.

Über das chemische Verhalten der gerinnungshemmenden Substanz sei bemerkt, daß sie kurzes Erhitzen verträgt. Im Verlauf der zu Blutdruckversuchen (s. Teil II) vorgenommenen Extraktionen von Uterus, Myomen, Ovarien, Corpora lutea zeigte es sich, daß diese gerinnungshemmenden Substanzen durch längeres Kochen in ihrer Wirkung herabgesetzt, aber nicht zerstört werden. Manche Kochextrakte sind imstande, auf Stunden

und Tage hinaus das Kontrollsystem Plasma + Serum an seiner Gerinnung zu verhindern, aber immerhin wurden so hohe Zahlen wie mit Preßsäften hier nicht erzielt. Ferner ist die Substanz in warmem 80%igen (und absolutem) Alkohol löslich.

Wie bekannt, sind gerinnungshemmende Substanzen verschiedener Art beobachtet worden. Morawitz<sup>1)</sup> hat die einschlägigen Angaben in sehr lehrreicher Weise tabellarisch zusammengestellt. Soweit die betreffenden Stoffe isoliert zur Beobachtung gekommen sind, lassen sie sich in zwei Gruppen scheiden: 1. solche vom Verhalten des Hirudins, die Gerinnungshemmung *in vitro* beim Zusammenbringen mit Blut und *in vivo*, d. h. nach intravenöser Injektion, erzeugen; 2. solche vom Verhalten des Peptozyms: Gerinnungshemmung *in vivo*, nicht *in vitro*.

Die Hemmungssubstanz des Uterus und Ovarium gehört ausgesprochen der Hirudingruppe an. Es bleibt dann noch fraglich, ob sie eine Antithrombin- oder eine Antikinasewirkung entfaltet. Die oben mitgeteilten Versuche, wonach Gänseplasma (das frei ist von Thrombin) auf Zusatz von Pferdeserum (Thrombin) nicht gerinnt, wenn genügend Ovarial- oder Uteruspreßsaft zugefügt wird, sprechen entschieden für die Anwesenheit eines Antithrombins. Die Frage, ob daneben Antikinase vorhanden ist, läßt sich noch nicht entschieden beantworten. Man kann danach die wirksame Substanz vorläufig als Antithrombin bezeichnen, wobei natürlich nicht die chemische Identität mit den sonst beobachteten Antithrombinen behauptet werden soll.

Von den neuerdings von Dold<sup>2)</sup> mitgeteilten Untersuchungen über die Giftigkeit von wässerigen Organextrakten sei hervorgehoben, daß es sich, zum Unterschied von meinen Preßsäften, um starke Gifte handelt, die thermolabil sind und bei intravenöser Injektion das Blut auf lange Zeit hinaus ungerinnbar machen. Dadurch ist die Verschiedenheit der beiden Substanzen in genügender Weise charakterisiert; über das Verhalten seiner Extrakte der Gerinnung *in vitro* gegenüber und ihre Wirkung auf den Blutdruck hat Dold keine Angaben gemacht.

---

<sup>1)</sup> Ergebnisse der Physiologie von Asher-Spiro 4.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Immunitätsforschungen u. experim. Ther. 10, 1911.  
Biochemische Zeitschrift Band 28.

### V. Das Vorkommen der gerinnungshemmenden Substanz im Menstruationsblut.

Es fragt sich nun, ob die gerinnungshemmende Wirkung von Uterus und Ovarien in diesen Organen allein vorhanden oder auch im Körperblut nachweisbar ist. Falls das Antithrombin reichlich in das Blut übergeht, so muß sich dieses bei Patientinnen, deren Uterus eine besonders stark hemmende Wirkung aufweist, durch eine deutliche Verlängerung der Gerinnungszeit äußern. Dies ist nun nicht der Fall. Bei allen untersuchten Patientinnen habe ich nur einmal eine Gerinnungszeit des aus der Fingerbeere entnommenen Blutes von 6 Min. beobachtet, sonst immer 5 und  $5\frac{1}{2}$  Min. (Bürkersche Methode bei Zimmertemperatur). Bei einer einzigen Patientin, die besonders stark ausgeblutet eingeliefert wurde und bald darauf verstarb, betrug die Gerinnungszeit  $3\frac{1}{2}$  Min. Auch zur Zeit der Menstruation, wo man vermuten kann, daß das gerinnungshemmende Moment des Uterus in Aktion tritt, ist eine verzögerte Blutgerinnung des Körperblutes nicht mit Sicherheit nachzuweisen. Es schien nach den Untersuchungen von Birnbaum und Osten<sup>1)</sup> und zum Teil nach den Versuchen von Schittenhelm<sup>2)</sup>, als ob bei der Menstruation eine Verzögerung der Blutgerinnung vorhanden wäre. Diese Ansicht wird aber durch die Arbeiten von Hartmann<sup>3)</sup> und Schwab<sup>4)</sup> und durch eigene Untersuchungen<sup>5)</sup> nicht bestätigt.

Die von Birnbaum angewandte Methode ist nicht frei von Fehlerquellen. Dies geht wohl auch aus den stark untereinander abweichenden Zahlen hervor. Wesentlich befriedigendere Resultate erhielten Schwab mit Hilfe der mikroskopischen Bestimmung der Gerinnungszeit und Hartmann mit der Bürkerschen Methode. Die Schwankungen der einzelnen Beobachtungszeiten sind sehr gering und die vielfache Überein-

---

<sup>1)</sup> Versuche über die Gerinnung des Blutes während der Menstruation Arch. f. Gyn. 80.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 1906.

<sup>3)</sup> Zur Frage der Blutgerinnungszeit, Münch. med. Wochenschr. 16, 1909.

<sup>4)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1906 und 1907.

<sup>5)</sup> Die ausführliche Publikation wird demnächst durch Dr. Keller erfolgen.

stimmung der Zahlen beider Autoren untereinander sprechen wohl für ihre Methoden. Beide haben festgestellt, daß das Körperblut während der Menstruation nicht langsamer gerinnt als außerhalb derselben. Diese Beobachtung kann ich bestätigen. Ein Übergang der in Uterus und Ovarien nachgewiesenen hemmenden Substanzen in den allgemeinen Kreislauf findet also während der Menstruation in nachweisbarer Weise nicht statt.

Daß die Beibringung größerer Mengen von Ovarialantithrombin in das Blut einen Einfluß auf die Gerinnungszeit zur Folge hat, geht aus meinen Erfahrungen hervor. Ich verweise hier auf einen Blutdruckversuch aus dem 2. Teil dieser Arbeit, in welchem dem Kaninchen im ganzen 50 ccm Ovariumpreßsaft injiziert worden waren. Das vor der Operation entnommene Blut war nach  $7\frac{1}{2}$  Min. geronnen (Bestimmung der Gerinnungszeit in der gewohnten Weise mit Gänseplasma). Nach Beendigung der Injektion wurde in derselben Weise festgestellt, daß die Gerinnung des Blutes nach 24 Min. anfang und mit 29 Min. zu Ende war. Auch 24 Stunden später war die Gerinnungszeit noch nicht die vor der Injektion festgestellte: das entnommene Blut war erst nach 12 Min. geronnen.

In einem anderen Falle, in dem 55 ccm Preßsaft injiziert wurden (Blutdruckversuch 3), betrug die Gerinnungszeit vor der Injektion 6 Min. und nach Beendigung derselben 11 Min.

Größere Unterschiede findet man nach intravenöser Injektion von konzentrierten Preßsäften oder Extrakten (s. 2. Teil). Im Versuch 28 hatte das Tier vor Beginn des Versuches eine Blutgerinnungszeit von 7 Min.; das nach Beendigung des Versuches entnommene Blut war nach  $\frac{5}{4}$  Stunden noch nicht geronnen. Ähnlich im Versuch 29: vor dem Versuch gerann das Blut nach 6 Min., nach dem Versuch war es nach  $\frac{1}{2}$  Stunde noch ungeronnen. Am intensivsten war die Verzögerung im Versuche 24: vor Beginn des Versuches gerann das Blut innerhalb  $3\frac{1}{2}$  Min., nach Beendigung desselben erst nach knapp 6 Stunden. Aus solchen Zahlen darf man wohl folgern, daß durch diese Extrakte die Gerinnungszeit des Blutes wesentlich verzögert werden kann. Nach 24 Stunden war die Gerinnungszeit immer wieder annähernd normal.

Während sich sonach in dem zirkulierenden Blut der menstruierenden Frau ein vermehrter Antithrombingehalt nicht nachweisen läßt, ist er im Menstruationsblut selbst sehr ausgesprochen vorhanden.

Um zunächst über die Nichtgerinnbarkeit dieses Blutes ein Urteil zu gewinnen, habe ich solches mehrmals möglichst sauber aufgefangen und in sterilen und unsterilen Gläsern aufbewahrt. Es blieb in beiden Fällen wochen- und monatelang ungeronnen. Daß dies durch die Anwesenheit eines

Antithrombins bedingt ist, geht daraus hervor, daß Menstruationsblut frisch oder noch nach Monaten die Gerinnung des Systems Plasma + Serum viele Stunden oder Tage aufhalten kann. Hier unter anderen ein Versuch vom 12. VI. 11:

Nr. 2. Gänseplasma 15 Tropfen + Pferdeserum 15 Tropfen: nach 27 Min geronnen.

Nr. 30. Gänseplasma 15 Tropfen + Pferdeserum 15 Tropfen + Menstruationsblut 15 Tropfen: nach 10 Tagen noch nicht geronnen.

Das zu diesem Versuche verwendete Blut war in einem saubern, aber unsterilen Glase 4 Monate lang im Kühlschrank aufbewahrt worden. Zur Zeit des Versuches war es noch flüssig.

Durch Extraktion mit kochendem Alkohol (s. 2. Teil) verliert das Menstruationsblut sein Hemmungsvermögen nicht, wenn es auch abgeschwächt wird. Zum Vergleich diene u. a. ein Versuch vom 17. II. 11.

Nr. 1. Gänseplasma 15 Tropfen + Pferdeblutserum 15 Tropfen: nach 22 Min. geronnen.

Nr. 9. Gänseplasma 15 Tropfen + Pferdeblutserum 15 Tropfen + alkohol. Extrakt von Menstruationsblut: nach 28 Stunden 23 Min. geronnen.

Nr. 10 (Kontrolle). Gänseplasma 15 Tropfen + Pferdeblutserum 15 Tropfen + alkohol. Extrakt von retroplacentarem Blut: nach 12 Min. geronnen.

Dem zirkulierenden Blute kommt, wie bekannt bei Tier und Mensch eine wesentlich hemmende Eigenschaft nicht zu. Auch Extrakte daraus hemmen die Gerinnung nicht, sie beschleunigen sie vielmehr in vielen Fällen.

#### V. Schlußbemerkungen.

Die Vermutung von der die vorliegenden Untersuchungen ausgegangen waren, daß in dem Menstruationsblut und eventuell in dem Uterus besondere Substanzen vorhanden sein müssen, die zur Blutgerinnung in einer bestimmten Beziehung stehen, findet durch diese Versuche eine einwandfreie Bestätigung. Es hat sich ergeben, daß Ovarien, uterus und Menstruationsblut ein gerinnungshemmendes Agens, ein Antithrombin von großer Wirksamkeit enthalten. Daß das Antithrombin des Menstruationsblutes von dem im Uterus nach-

weisbaren herstammt, dürfte nicht leicht bezweifelt werden. Bei dem funktionellen Zusammenhang von Uterus und Ovarien und der Abhängigkeit der Menstruation von der Eierstocks-funktion drängt sich aber der weitere Schluß auf, daß es sich an allen drei Orten um das gleiche Antithrombin handelt. Ein Wahrscheinlichkeitsbeweis dafür wäre gegeben, wenn der Antithrombingehalt des Uterus und des Ovariums ebenso wie die Menstruation von den Geschlechtsfunktionen abhängig wäre. Dieser Beweis kann durch die Untersuchung der Uteri von Frauen, welche sich in der Menopause befinden, erbracht werden. Aus dem Gerinnungsversuch vom 2. VI. 11 seien z. B. folgende Zahlen mitgeteilt:

(Preßsaft des Uterus einer 60jährigen Frau, die seit 8 Jahren in der Menopause ist; Exstirpation des Uterus wegen Prolaps.)

Tabelle XVII.

Nr.	Gänseplasma	Pferdeserum	Uteruspreßsaft	Gerinnung trat ein nach
2	15 Tropfen	15 Tropfen	—	27 Min.
22	15 "	15 "	1 Tropfen	23 "
23	15 "	15 "	5 "	23 "
24	15 "	15 "	7 "	23 "
25	15 "	15 "	10 "	1 Std.
26	15 "	15 "	15 "	1 Std. 7 Min.

Ähnliche Zahlen ergaben sich für den Preßsaft der Ovarien.

Diese Uteri und Ovarien unterscheiden sich nicht mehr wesentlich von andern Organen (vgl. Tab. IV). Immerhin verhält sich selbst das Ovarium und der Uterus nach Eintritt der Menopause noch anders als parenchymatöse Organe, wie z. B. Gehirn und Leber (vgl. Tab. IV); etwas Besonderes möchte ich darin jedoch nicht erblicken, da auch der Preßsaft der Niere, der Thymus, der Schilddrüse z. B. die Gerinnung um einige Stunden verzögern kann (vgl. Tab. V). Das charakteristische gerinnungshemmende Moment des Uterus und der Ovarien aus dem fortpflanzungsfähigen Alter ist diesen Organen jedenfalls verloren gegangen.

Man wird aus dem Abhängigkeitsverhältnis des Uterus von der Ovarialfunktion den Schluß ziehen dürfen, daß die Quelle des betreffenden Antithrombins im Ovarium zu suchen ist, und daß es von da aus in den Uterus und aus diesem in

das Menstruationsblut gelangt. Dieser Schluß wird nicht entkräftet durch die Tatsache, daß auch Uterus und Ovarien jugendlicher Individuen noch vor der Pubertät Antithrombin enthalten<sup>1)</sup>, denn als das einzige die Menstruation auslösende Moment kann die Antithrombinwirkung nicht angesehen werden. Ebensovienig kann eingewendet werden, daß auch einige andere Organe (Schilddrüse, Nebenniere, Thymus) Antithrombin, wenn auch in geringer Menge, enthalten. Vielleicht steht dieser Befund mit dem auch bei männlichen Tieren nachweisbaren Antithrombingehalt des Blutes in Beziehung. Daß diese Organe aber bei weiblichen Individuen zum Übertritt von Antithrombin ins Menstruationsblut Anlaß geben, hat beim Mangel eines funktionellen Zusammenhanges kaum etwas für sich. Hingegen vermag ich für die Abstammung des Antithrombins vom Ovarium noch die Tatsache anzuführen, daß sich auch für eine andere im Menstruationsblut auftretende Substanz, die gefäßerweiternd wirkt, das Vorkommen im Uterus und Ovarium nachweisen ließ, worüber in der nächsten Abhandlung berichtet werden wird. Die Ausstoßung solcher, durch „innere Sekretion“ im Ovarium erzeugter, dann sukzessive in kleinen Mengen in den Kreislauf übergehender Stoffe mit dem Menstruationsblute kann als eine Art Exkretion von für den Organismus unverwertbaren Stoffen angesehen werden, für die die althergebrachte Bezeichnung „monatliche Reinigung“ nicht ganz unzutreffend erscheint.

---

<sup>1)</sup> Die Versuche sind in der oben beschriebenen Weise mit Ovarien und Uteri vom Kalb angestellt worden.

---



# Untersuchungen über die innere Sekretion der Ovarien.

Von

G. Schickele.

(Ausgeführt mit Unterstützung der Cunitz-Stiftung.)

## II.

### Das Vorkommen gefäßerweiternder Substanzen im weiblichen Geschlechtsapparat.

Aus dem physiologisch - chemischen Institut und der Frauenklinik der Universität Straßburg i. E.).

(Eingegangen am 29. November 1911.)

Mit 12 Figuren im Text.

## I.

Es ist durch mehrfache Beobachtung sichergestellt, daß die Eierstöcke eine blutdruckherabsetzende Substanz enthalten.

Livon<sup>1)</sup> stellte auf Grund seiner Versuche mit wässerigen Extrakten die Ovarien zu den hypotensiv wirkenden Drüsen, neben Leber, Lunge, Pankreas, Thymus und Hoden. Später wurde diese depressorische Wirkung von Vincent und Sheen<sup>2)</sup>, Patta<sup>3)</sup>, Hallion<sup>4)</sup>, Busquet und Pachon<sup>5)</sup>, Villemin<sup>6)</sup> und anderen unter wechselnden Bedingungen beobachtet. Dabei waren teils mit kalter, teils mit siedender physiologischer Kochsalzlösung, teils mit Alkohol bereitete Extrakte wirksam gefunden worden. Über das Zustandekommen der Depression geben Beobachtungen von Patta und von Busquet und Pachon einigen Aufschluß, da sie lehrten, daß sie auch nach doppelseitiger Vagusdurchschneidung und nach Atropinisierung nicht ausbleibt, somit vorwiegend peripheren Ur-

---

1) Compt. rend. Soc. Biol. 1898.

2) Ergebn. d. Physiol. Asher-Spiro 1910.

3) Arch. di Farmacolog. 6.

4) Compt. rend. Soc. Biol. 2, 1907.

5) Compt. rend. Soc. Biol. 1, 1910.

6) Thèse de Lyon 1908.

sprungs sein muß. Daß auch Extrakte von frischen Corpora lutea eine Senkung des Blutdruckes veranlassen, geht aus den Versuchen von Villemain und von Bielow<sup>1)</sup> hervor.

Diesen anscheinend eindeutigen Angaben stehen Beobachtungen gegenüber, wonach Ovarienextrakte gelegentlich nicht Blutdrucksenkung, sondern das Gegenteil erzeugen (Patta) oder überhaupt keine merklichen Wirkungen entfalten. In dieser Richtung sei die aus neuester Zeit stammende Angabe Biedls<sup>2)</sup> erwähnt, „der bei sorgfältiger Prüfung von verschiedenartig bereiteten Extrakten aus Eierstockgewebe auf etwaige hämodynamische Wirkungen“ niemals spezifische, sondern „stets nur solche Effekte wahrnehmen konnte, die auf das Vorhandensein von gerinnungsfördernden Substanzen in diesen Extrakten hinwiesen“.

Wenn es schon in bezug auf das Vorhandensein einer depressorischen Wirkung der Ovarien nicht an Unklarheiten fehlt, so ist weiter auch die Frage, ob diese Wirkung etwas für die Ovarien Spezifisches darstellt, noch mehr einer Untersuchung bedürftig. Denn, wie Livon, Schaefer und Moore, Osborne und Vincent, Bayliss und Starling, Vincent und Sheen u. a. gezeigt haben, ist diese blutdruckherabsetzende Wirkung bei Organextrakten überhaupt recht verbreitet. Für die mich beschäftigende Frage nach der inneren Sekretion der Ovarien kam daneben noch weiter in Betracht, ob die depressorisch wirkende Substanz der Ovarien, ähnlich wie sich das betreffs der gerinnungshemmenden ergeben hatte, auch im Uterus, eventuell auch im Menstruationsblut, sich nachweisen läßt und ob auch Tatsachen vorhanden sind, die für einen Zusammenhang einer solchen in den Ovarien gebildeten Substanz mit der Sexualfunktion sprechen.

## II.

### Zur Methodik.

Die obenerwähnten sich widersprechenden Ergebnisse der Untersucher sind, wie mich Versuche lehrten, wenigstens zum Teil auf Abweichungen in der Darstellung der Extrakte zu beziehen. Wie bei der gerinnungshemmenden Substanz besteht auch betreffs der depressorischen eine sehr merkliche Verschiedenheit zwischen kalt bereiteten Extrakten und Preßsäften.

Gewöhnliche mit kalter physiologischer Kochsalzlösung bereitete Auszüge der frischen in der Fleischhackmaschine zerkleinerten Organe scheinen keine gleichmäßige Wirkung zu haben. Nach Injektion von mehreren Kubikzentimetern kalten Kochsalzextraktes von Corpus luteum, Ovarium und Uterus (Rind) tritt im Kymographionversuch entweder gar keine oder nur eine

<sup>1)</sup> Ref. in Münchn. med. Wochenschr. 1910, 1907.

<sup>2)</sup> Innere Sekretion 1910.

kleine vorübergehende Senkung ein. In einigen Fällen wurde sogar ein geringer vorübergehender Anstieg des Blutdruckes beobachtet.

Kalt bereitete Preßsäfte sind hingegen ausgesprochen wirksam. Zur Beleuchtung dieser Verschiedenheit sei nachstehender Versuch angeführt (2. XI. 10):

1. Eine gewisse Quantität von Kuhovarien wird zerkleinert und zerhackt,  $2 \times 24$  Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung kalt extrahiert, die Flüssigkeit abgossen, filtriert, getrocknet, zu einem feinen Pulver zerrieben und nun mit einer minimalen Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und filtriert (Fraktion 1). 2. Der nach dem Abgießen der Extraktionsflüssigkeit zurückgebliebene Organbrei wird jetzt mit Kieselgur und Quarzsand energisch zerrieben und dann in der Buchnerschen Presse unter hohem Druck ausgepreßt. Der so gewonnene Preßsaft wird getrocknet, dann später als Pulver mit einem Minimum physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen (Fraktion 2). 3. Dieselbe Menge frischer Ovarien wird zerkleinert, mit Quarzsand im Mörser fein zerrieben und  $2 \times 24$  Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung kalt extrahiert. Die Flüssigkeit wird dann abgossen, filtriert, getrocknet, als Pulver mit einem Minimum Kochsalzlösung aufgenommen und wieder filtriert (Fraktion 3). 4. Der nach dem Abgießen der Extraktionsflüssigkeit zurückgebliebene Organbrei wird wie in Fraktion 2 in der Buchnerschen Presse ausgepreßt (Fraktion 4).

Die Extraktionsflüssigkeiten der Fraktionen 1 und 3 wirken nicht gerinnungshemmend; intravenös injiziert rufen sie eine geringe Steigerung des Blutdruckes und oft starke Unruhe des Tieres hervor. Dagegen bewirken Fraktion 2 und 4 intravenös injiziert eine deutliche Blutdrucksenkung und in vitro eine Hemmung der Gerinnung. Wie ich in der vorigen Mitteilung ausgeführt habe, wirken die in die einfachen Extrakte vor allem übergehenden Gewebeflüssigkeiten gerinnungsbeschleunigend, außerdem — wie oben gezeigt — blutdrucksteigernd. Die depressorische Wirkung darf daher ebenso wie die gerinnungshemmende als dem eigentlichen Organgewebe zukommend angesehen werden. Diesen depressorisch wirkenden Substanzen gehen auch die akut toxischen, rasch zum Tode führenden Erscheinungen ab, wie sie z. B. O. O. Fellner<sup>1)</sup> bei intravenöser Injektion von Uterusextrakten beobachtet hat. Es darf wohl die Frage aufgeworfen werden, ob es sich da nicht vielfach um intravasale Blutgerinnungen mit ihren wechselvollen

<sup>1)</sup> Zentralblatt f. Physiol. 1909.

Folgeerscheinungen gehandelt hat, zumal Hirudin die Tiere rettete.

Die Herstellung größerer Mengen von Preßsäften ist zeitraubend; deshalb wurde versucht, die wirksamen Substanzen durch Alkoholextraktion zu gewinnen. Dies gelingt jedoch nicht ohne weiteres. Kalte alkoholische Extrakte getrockneter und pulverisierter Ovarien, Corpora lutea oder Uteri haben keinen nennenswerten Einfluß auf den Blutdruck. Werden ferner frische zerkleinerte oder getrocknete und pulverisierte Organe mehrere Stunden in der Schüttelmaschine mit physiologischer Kochsalzlösung, Alkohol oder Äther extrahiert, so vermögen diese Extrakte nicht selten den Blutdruck zu erniedrigen wenn auch nur ausnahmsweise so stark wie die Preßsäfte. Es scheint jedoch, daß diese ebenso wie die schon angeführten kalt bereiteten nicht depressorisch wirkenden Extrakte in dem Sinne toxisch wirken, als sie häufig zahlreiche und intensive Zuckungen auslösen, außerdem häufiger den Tod herbeiführen.

Anders steht es aber bei der Extraktion mit kochendem Alkohol. Diese wurde in folgender Weise ausgeführt:

Nach der Zerkleinerung der Organe in der Fleischhackmaschine und Trocknen im Vakuum wird der Rückstand fein gemahlen. Dieses Pulver wird mit dem 2 bis 3fachen Volumen 80 bis 95% Alkohol mehrere Minuten gekocht, der Alkohol nach Erkalten abgeseiht, neuer Alkohol zugegeben, wiederum gekocht usw., bis der Alkohol keine Farbe mehr annimmt. Die zusammengegoßenen Alkoholmengen werden im Vakuum eingedunstet (oder überdestilliert und der Rest eingedunstet), der Rückstand mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, im Mörser zerrieben und dann filtriert. Die so gewonnene Flüssigkeit war meistens klar und sehr wirksam. Eine Reinigung des Organpulvers mit Äther vor der Alkoholextraktion ist insofern zweckmäßig, als die Endflüssigkeit sich dann leichter filtrieren läßt.

Ich habe mich in meinen Versuchen zuerst der Preßsäfte — hauptsächlich in konzentrierter Form —, später der durch Extraktion mit heißem Alkohol gewonnenen Auszüge bedient.

Als Ausgangsmaterial wurden frisch extirpierte Ovarien und Uteri von Menschen verwendet, sodann, namentlich für die Untersuchung der Corpora lutea, aus dem Schlachthofe frisch bezogene Organe vom Rind. Die Blutdruckversuche sind — von wenigen an Hunden vorgenommenen abgesehen — an Kaninchen ausgeführt. Von einer Curararisierung wurde

Abstand genommen, da die blutdruckherabsetzende Wirkung der Curarepräparate vermieden werden mußte.

Da eine quantitative Bestimmung der wirksamen Substanz zurzeit unmöglich ist, haben die Angaben über die injizierten Mengen nur den Wert einer ungefähren Orientierung.

### III.

#### Die Wirkungsweise der depressorischen Substanz.

##### A. Blutdruckwirkung.

Nach Injektion von mehreren Kubikzentimeter von Uteruspreßsaft tritt eine geringe Blutdrucksenkung ein, anfangs von geringer Intensität und kurzer Dauer, etwa den Befunden der obengenannten Autoren entsprechend. Bei mehreren Injektionen wiederholt sich diese Senkung um so deutlicher, je größere Mengen injiziert werden. Vor allem aber tritt hervor, daß von der Menge der Injektion nicht so sehr die Tiefe als die Dauer der Senkung abhängt. Preßsäfte von Uterus, Ovarium und Corpus luteum haben die gleiche Wirkung.

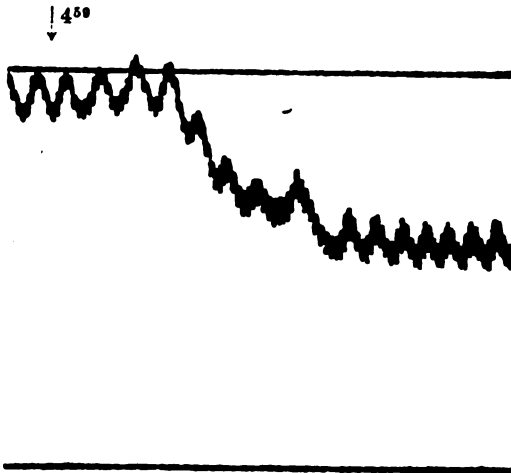


Fig. 1. Hund in Urethannarkose.  $4^{50}$  Injektion von 10 com Preßsaft vom Uterus (Rind). (Versuch 3.)

Da nun die Injektion größerer Flüssigkeitsmengen für genauere Untersuchungen unzweckmäßig ist, wurde später mit

konzentrierten Preßsäften gearbeitet. Der Preßsaft wurde im Vakuum getrocknet und der feinzerriebene Rückstand mit

möglichst wenig physiologischer Kochsalzlösung im Mörser vermengt, dann abfiltriert. Die so gewonnenen Flüssigkeiten waren mit wenigen Ausnahmen vollständig klar. Allerdings war die Ausbeute manchmal sehr gering (3 bis 5 ccm von 100 ccm Preßsaft), so daß manche dieser Versuche aus Mangel an Material nicht immer in gewünschter Weise zu Ende geführt werden konnten. Andererseits stellte es sich heraus, daß auch kleine Mengen so hergestellter konzentrierter Preßsäfte genügten, um einen Ausschlag zu ergeben.

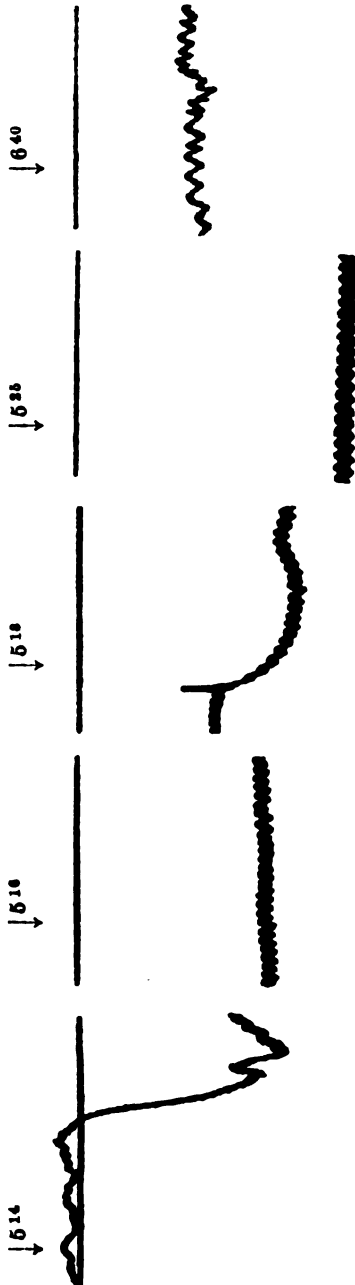


Fig. 2 (Versuch 5).

#### Versuch 5. Kaninchen.

##### Konzentrierter Ovariumpreßsaft (Rind).

5<sup>14</sup> erste Injektion von 1 ccm Preßsaft.

5<sup>18</sup> zweite Injektion von 1 ccm Preßsaft.

Ein Kubikzentimeter genügt schon, um eine tiefe Senkung von 110 auf 58 mm Quecksilber auf mehrere Minuten zu erzielen. Die zweite Injektion drückt den Blutdruck noch weiter herunter bis auf 36 mm. 15 Minuten nach der zweiten Injektion fängt der Blutdruck an, sehr langsam zu steigen, nach 1 Std. steht er auf 80 mm, nach 1<sup>3</sup>/<sub>4</sub> Std. hat er die Norm erreicht.

Dieselbe Wirkung besitzt der Uteruspreßsaft vom Rind.

**Versuch 6. Uteruspreßsaft vom Rind.**

Nach Injektion einer kleinen Dosis (0,4 ccm) tritt eine sofortige Senkung des Blutdruckes um 36 mm ein, die nach einem vorübergehenden Anstieg langsam zunimmt und mehrere Minuten lang dauert. Auch hier wird die Depression durch weitere Injektionen vertieft. Je nach der Größe der Dosis steigt der Blutdruck nach verschieden langer Zeit wieder auf die Norm zurück.

Das Corpus luteum hat als konzentrierter Preßsaft dieselbe Wirkung auf den Blutdruck (vgl. Fig. 3).

Mit jeder Injektion ist eine neue, wenn auch manchmal kleine Senkung zu beobachten, die sich gewissermaßen zu den vorhergehenden hinzuaddiert.

Dieselbe Wirkung hat auch Preßsaft des menschlichen Uterus, der Tuben und der Uterusmyome.

Ovarien, aus denen die Corpora lutea entfernt worden sind, besitzen dieselbe Wirkung wie die Corpora lutea allein.

Nach manchen Versuchen scheint das Cor-

pus luteum stärker zu wirken als das Ovarium allein, dieses wiederum stärker als der Uterus. Ich kann jedoch nicht nachweisen — so verlockend dies wäre —, daß dieses Verhältnis regelmäßig besteht. Offenbar hängt die Menge der wirksamen Substanz

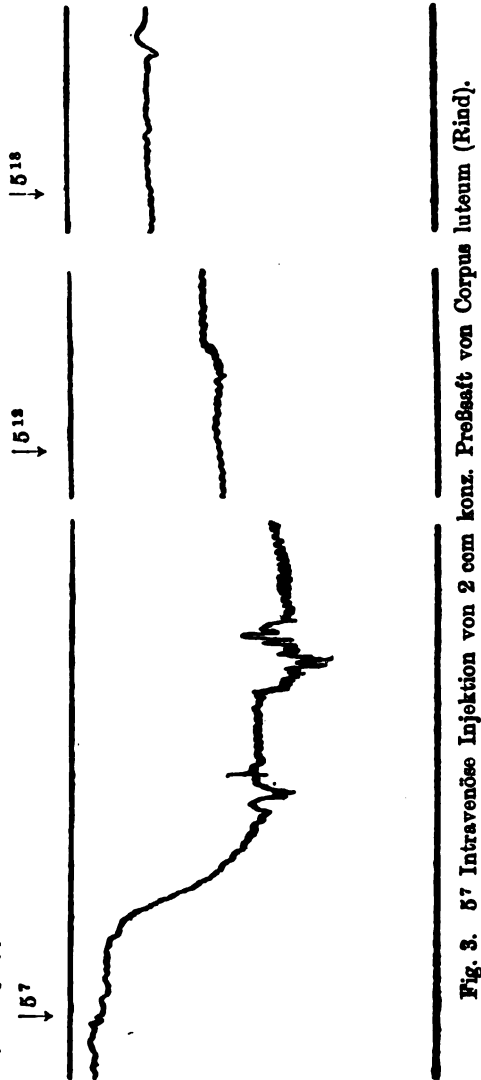


Fig. 3. 57 Intravenöse Injektion von 2 ccm konz. Preßsaft von Corpus luteum (Rind).

von zahlreichen augenblicklich noch nicht übersehbaren Momenten ab.

Ganz ähnlich ist die Wirkung der mit Alkohol be-

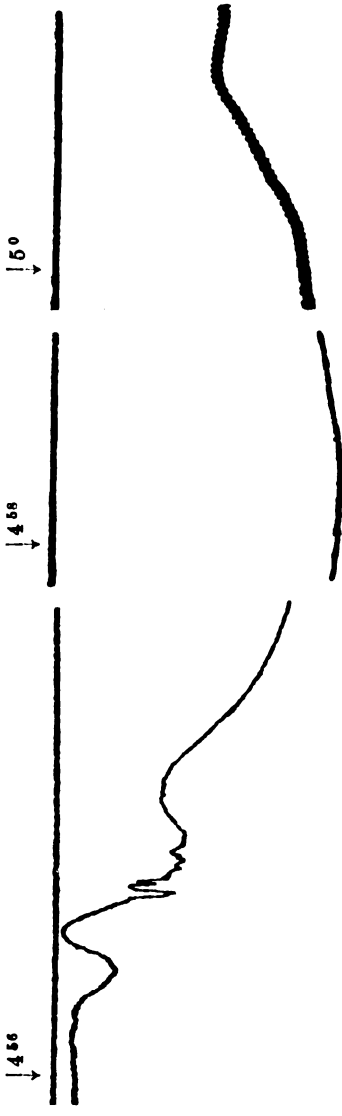


Fig. 4. 4<sup>86</sup> Intravenöse Injektion von 1 cem alkohol. Uterusextrakt (Rind).

reiteten zum Schluß in physiologischer Kochsalzlösung intravenös beigebrachter Extrakte. So fiel zum Beispiel im Versuch 19 nach der Injektion von 1 cem eines solchen Uterusextraktes der Blutdruck von 104 mm auf 34 mm und blieb mehrere Minuten lang unter der Norm (siehe Fig. 4).

Die Wirkung der in diesen Extrakten von Ovarium, Corpus luteum, Uterus usw. enthaltenendepressorischen Substanz<sup>1)</sup> ist im Durchschnitt bei intravenöser Beibringung nach meiner Erfahrung folgende: 10 bis 12 Sekunden nach der Injektion fällt der Blutdruck innerhalb weniger Sekunden ganz rasch; zuweilen kommt noch ein kleiner Aufstieg zustande infolge von Muskelzuckungen; dann stellt sich, langsam zunehmend, die eigentliche Senkung ein, die nicht

<sup>1)</sup> Wenn von einer Substanz die Rede ist, so geschieht dies der Einfachheit wegen. Die Möglichkeit, daß es sich um ein Gemenge mehrerer in ähnlichem Sinne wirkender Stoffe handelt, kann natürlich nicht mit voller Sicherheit ausgeschlossen werden.



selten schon nach zwei wirksamen Injektionen den tiefsten Stand erreicht; hierauf steigt der Blutdruck, falls weitere Injektionen ausbleiben, langsam annähernd oder ganz zur Norm zurück. Dieser zweite Teil der Kurve, der Wiederanstieg, erfolgt außerordentlich verschieden. Bei größeren Dosen kann er über eine Stunde, ja sogar noch länger, sich hinziehen. Die nach den ersten Injektionen auftretende Senkung wird hin und wieder durch mit den Muskelzuckungen parallel gehende kurzdauernde Steigerungen unterbrochen. Nach weiteren Injektionen und bei genügender Dosierung tritt aber auch dann — von ganz seltenen Ausnahmen abgesehen — die typische Senkung ein. Dies gilt in gleichmäßiger Weise für Uterus-, Ovarium- oder Corpus luteum-Extrakte.

Nach mehreren aufeinanderfolgenden Injektionen ist fast immer eine Summierung der Wirkung in dem Sinne zu beobachten, daß jede einzelne Injektion den Blutdruck immer noch etwas herunterdrückt, bis das Maximum der Senkung erreicht ist. Auf diese Weise gelingt es, den Blutdruck mehrere Stunden lang — je nach Belieben — tief unter der Norm zu halten.

Es ist nach dem vorläufigen Stand der Untersuchungen über die blutdruckherabsetzende Substanz schwer, über die Intensität ihrer Wirkung ein Urteil zu fällen. Da schwach gefärbte Extrakte, die nur wenig organische Substanz enthielten, sehr starke Wirkung entfalteten, dürfte es sich um eine erhebliche Wirksamkeit handeln, die z. B. jene des Witte-Peptons weit übertrifft. Sicherer ist das Urteil über die Nachhaltigkeit der Wirkung, die durch die Summierung der Wirkung bei wiederholter Beibringung und durch die lange Dauer der Depression charakterisiert erscheint.

Bemerkenswert ist die nicht allzu große Giftigkeit der Extrakte. Die Tiere verhalten sich allerdings sehr verschieden; manche gehen nach wenigen Kubikzentimetern rasch zugrunde, andere bleiben trotz großer Dosen am Leben. In meinen Versuchen ist im ganzen ein Drittel der Tiere zugrunde gegangen, und zwar der kleinere Teil von ihnen während oder kurz nach dem Experiment, die übrigen 24 bis 48 Std. später.

Es muß überhaupt davor gewarnt werden, auf Grund weniger Versuche sich ein Urteil über die Wirkung der Ovariumextrakte

zu bilden. Man trifft manche Tiere, bei denen erst nach mehreren starken Dosen eine deutliche und dauernde Senkung eintritt, manche, bei denen wohl Depressionen zustande kommen, aber nur von kurzer Dauer, und andere endlich, bei denen immer wieder auftretende Zuckungen die Beobachtung unmöglich machen. Solchen Verschiedenheiten ist man beim Kaninchen stets ausgesetzt. Etwas Ähnliches scheint es bei Adrenalinversuchen am Kaninchen ebenfalls zu geben. So haben Bonnamour und Thèvenot (C. r. Soc. Biol. 1, 1909, S. 509) beobachtet, daß die Adrenalininjektion für manche Kaninchen sehr toxisch und tödlich wirkt, bei anderen aber nur zahlreiche Zuckungen hervorruft, ohne aber zum Tode zu führen. Trotzdem möchte ich nicht glauben, daß manche Tiere eine Immunität gegen Ovariumextrakte besitzen. Auch durch mehrmalige Behandlung mit Extrakten wird eine Immunität nicht erworben. Wenn man nach 8 bis 14 Tagen bei demselben Tiere einen 2. Blutdruckversuch anstellt, ist die Depression beim 2. Versuch ebenso prompt und charakteristisch wie beim ersten (Versuch 24 und 28; 26 und 29). Ebenso ist es, wenn man Tieren mehrmals und in längeren Abständen wirksame Dosen in die Ohrvene injiziert, sie gewissermaßen „sensibilisiert“ und dann erst den Blutdruckversuch vornimmt: Das Tier reagiert ebenso wie ein vorher nicht behandeltes Tier. Es wird also auch keine Anaphylaxie durch wiederholte Injektionen von Ovariumextrakten hervorgerufen, gleichgültig, ob die Injektionen intravenös oder subcutan ausgeführt werden.

Zur schärferen Charakterisierung der Wirkungsweise wurde das Verhalten gegenüber einigen anderen Gefäßgiften untersucht.

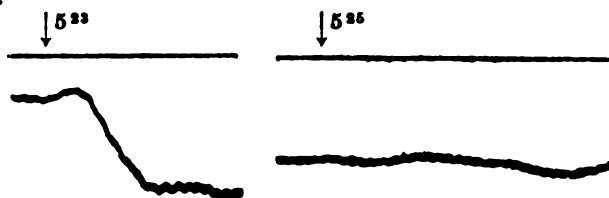


Fig. 5.  $5^{23}$  0,4 cem konz. Uteruspreßsaft (menschlich).  
 $5^{25}$  0,001 cem Atropin.

Atropin hat auch in großen Dosen keinen Einfluß auf die depressorische Wirkung der obengenannten Extrakte. Diese

Tatsache wurde im Laufe zahlreicher Versuche immer wieder festgestellt und entspricht den früher erwähnten Angaben von Busquet und Pachon (vgl. Fig. 5).

Adrenalin: 1. Bei Tieren, deren Blutdruck durch mehrfache Injektionen von Uterus- oder Ovarienpreßsaft dauernd herabgesetzt ist, bedarf es größerer Mengen von Nebennierenpreßsaft oder Adrenalinlösung, um die typische Adrenalinsteigerung zu erhalten, als bei Normaltieren.

#### Versuch 10.

Das Tier steht unter starker Blutdrucksenkung infolge der mehrfachen Injektion von Uteruspreßsaft: 5<sup>52</sup> 64 mm unter der Normallinie.

6<sup>1</sup> 0,2 ccm konz. Nebennierenpreßsaft (wie Ovariumpreßsaft hergestellt); sofortiger Anstieg um 54 mm.

6<sup>4</sup> und 6<sup>9</sup> je 1 ccm Uteruspreßsaft, ohne Einfluß auf die langsam abfallende Nebennierenkurve, die 6<sup>17</sup> 64 mm unter der Norm ist.

6<sup>18</sup> 0,2 ccm konz. Nebennierenpreßsaft + 0,8 ccm konz. Uteruspreßsaft: der Blutdruck steigt um 60 mm.

6<sup>20</sup> 1 ccm konz. Uteruspreßsaft: sofort Abfall um 28 mm.

6<sup>26</sup> 1 ccm konz. Uteruspreßsaft: langsamer Abfall bis auf 56 mm unter die Norm.

6<sup>28</sup> 0,6 ccm konz. Nebennierenpreßsaft: Anstieg um 16 mm, nur vorübergehend, dann wieder wie vor der Injektion.

6<sup>36</sup> 0,2 ccm konz. Nebennierenpreßsaft, vorübergehender Anstieg um 20 mm, Abfall nach 20 bis 25 Sekunden.

Erst nach drei weiteren Injektionen von im ganzen 0,8 ccm konz. Nebennierenpreßsaftes kommt die charakteristische Nebennierenkurve zustande.

#### Versuch 46.

Nach Injektion von 5 ccm Ovariumextrakt (in größeren Abständen) war der Blutdruck von 104 mm auf 62 mm gefallen; darauf wird injiziert:

6<sup>34</sup> 0,0002 mg Adrenalin (Takamine); es tritt keine Wirkung ein. Es werden nun in immer steigenden Dosen — im ganzen mit 11 weiteren Injektionen — rund 0,06 mg Adrenalin beigebracht, ohne jede Wirkung; die Wirksamkeit des Präparates war in einem kurz vorhergegangenen Versuche geprüft worden und bestätigte sich auch noch in späteren Versuchen.

#### Versuch 11 (vgl. Kurve 6).

9<sup>5</sup> besteht eine starke Blutdruckerniedrigung nach Injektion von 1 ccm Uterusextrakt.

9<sup>7</sup> 0,01 mg Adrenalin (Takamine); es folgt ein vorübergehender Anstieg, der nach 8 bis 10 Sekunden wieder ausgeglichen ist. Erst nach

mehreren Dosen von im ganzen 0,09 mg Adrenalin kommt eine charakteristische Kurve zustande.

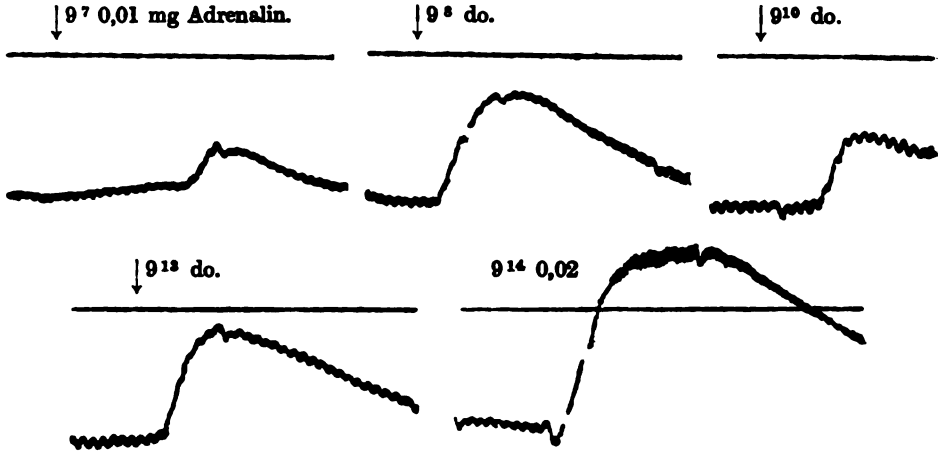


Fig. 6. Nach intravenöser Injektion von 1 ccm Uterusextrakt ist der Blutdruck von 110 auf 75 mm Quecksilber gefallen.  
Mehrfache Injektionen von Adrenalin.

2. Bei gleichzeitiger Injektion von Adrenalin und Preßsaft kann die sonst zu erwartende Blutdrucksteigerung auch ganz ausbleiben.

#### Versuch 12.

4<sup>24</sup> 0,03 mg Adrenalin intravenöse; typischer Anstieg, langsamer Abfall. Im Laufe der seicht abfallenden Kurve wird

5<sup>3</sup> 0,03 mg Adrenalin + 1 ccm Myompreßsaft intravenös injiziert: der Blutdruck fällt sofort. Eine Adrenalinwirkung ist also in dieser letzten Injektion überhaupt nicht zustande gekommen.

3. Die Injektion von Preßsaft oder Extrakt der genannten Organe vermag einen bereits durch Adrenalin erzeugten Blutdruckanstieg aufzuheben.

#### Versuche 19 (Kurve 7).

Trotzdem durch eine Injektion konzentrierten Uteruspreßsaftes eine intensive Senkung des Blutdruckes erfolgt war, gab die folgende Injektion von Nebennierenpreßsaft zunächst einen starken Anstieg, der nach kurzer Zeit von der üblichen Senkung gefolgt war (2. Teil der Nebennierenkurve!). Die dritte Injektion, wiederum Nebenniere, hatte prompt eine entsprechende Steigerung des Blutdruckes zur Folge; während der Blutdruck sich noch auf der Höhe befand, wurde 1 ccm konzentrierten Corpus luteum-Preßsaftes injiziert, worauf sofort ein jäher Abfall des Blutdruckes erfolgte; nach kurzer Zeit ging das Tier zugrunde.

Die Nebennierenwirkung läßt sich also auch auf ihrer Höhe durch Corpusluteumextrakt beeinflussen.

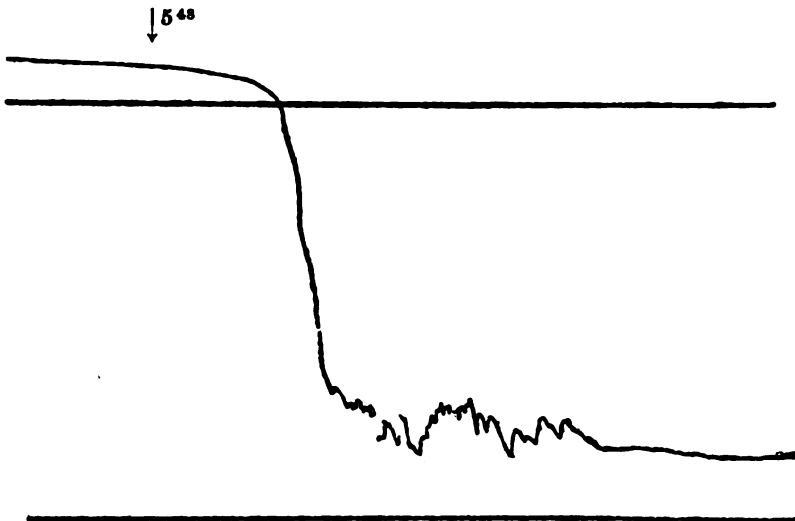


Fig. 7. Eine Injektion von 0,1 cem Nebennierenpreßsaft hatte den Blutdruck von 54 auf 123 mm Quecksilber gebracht. Bei dem Beginn des langsamen Abfalles wird 5<sup>48</sup> 1 cem konzent. Corpus-luteum-Preßsaft injiziert, worauf der Blutdruck von 120 mm sofort auf 34 und dann 18 mm sinkt.

Eine genauere Dosierung der Preßsäfte dem Adrenalin gegenüber ist zurzeit nicht durchführbar. Die Wirksamkeit des Adrenalins ist anscheinend viel erheblicher. Immerhin konnte z. B. im Versuche 12 ein cem Myompreßsaft die sicher wirksame Dosis von 0,03 mg Adrenalin aufheben.

Die Extrakte der Schilddrüse rufen, wie bekannt, bei intravenöser Injektion eine geringe und kurzdauernde Blutdrucksenkung hervor. Wenn man während der Dauer dieser Senkung eine intravenöse Injektion von Uterus-, Ovarium- oder Corpus-luteum-Preßsaft oder Extrakt gibt, dann tritt, entsprechend der Wirkung dieser Extrakte, eine weitere Senkung des Blutdruckes ein. Die Wirkungen dieser Extrakte summieren sich also.

Das gleiche gilt für Extrakte der Thymus. Die Extrakte dieser Organe waren in derselben Weise hergestellt wie jene der Ovarien usw; das gleiche gilt für die Preßsäfte.

### Hyphophysisextrakt.

In ganz ähnlicher Weise wie beim Adrenalin läßt sich auch mit Pituitrin<sup>1)</sup> bei entsprechender Dosierung eine Verminderung oder Aufhebung der Wirkung meiner Extrakte erzielen, aber auch umgekehrt. Nur wirkt Pituitrin nicht so energisch und nicht in so minimalen Dosen wie Adrenalin; deshalb ist wohl seine Wirkung leichter durch Ovariumextrakt zu paralysieren.

#### Versuch 45.

Das Tier befand sich im Stadium einer starken Blutdrucksenkung (es waren mehrere Injektionen von Ovariumextrakt vorhergegangen); es wurde dann weiter gegeben 5<sup>60</sup> 0,015 ccm Pituitrin, intravenös, ohne Wirkung. In acht schnell aufeinanderfolgenden Injektionen werden im ganzen 1,63 ccm Pituitrin injiziert, ohne daß der Blutdruck um das geringste ansteigt; eine weitere Injektion von 1 ccm Pituitrin bleibt ohne Erfolg.

Die Ovariumwirkung war also imstande, den Pituitrinanstieg völlig zu verhindern, trotzdem mehr als das 20fache der sonst wirksamen Pituitrindosis injiziert worden war.

Bemerkt sei nebenher, daß die Injektion des Ovariumextraktes in einem oder dem anderen Versuche zwar die Blutdrucksteigerung durch Pituitrin verhinderte, nicht aber die für Pituitrin charakteristische Pulsverlangsamung.

Auch Chlorbarium wird in derselben Weise durch die besprochenen Extrakte in seiner blutdrucksteigernden Wirkung beeinflußt.

#### Versuch 28.

Bei einem Tiere mit starker Blutdrucksenkung (infolge Corpus luteum-Injektion) hat 1 ccm einer 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>igen Chlorbariumlösung keinen Einfluß, während Adrenalin noch eine starke Steigerung des Blutdruckes hervorruft.

Selbst wenn man keine genaue toxikologische Analyse der Wirkung der Ovarialextrakte anstellt, ist nach dem Gesagten unverkennbar, daß die Blutdrucksenkung durch eine direkte Beeinflussung peripherer Gefäße zustande kommt. Bei der Sektion nach der Injektion zugrunde gegangener oder nach Beendigung des Versuches getöteter Tiere findet man in der

<sup>1)</sup> Eine größere Menge Pituitrin ist mir in dankenswerter Weise von der Firma Parke, Davis u. Cie. zu Versuchszwecken zur Verfügung gestellt worden.

Tat die Mesenterialgefäße stark erweitert, in ihnen überall flüssiges Blut; etwas weniger sind die Lungengefäße erweitert; das Herz ist prall mit flüssigem Blute gefüllt und steht in Diastole still. Gerinnsel habe ich nie innerhalb des Gefäßsystems nachweisen können. Herr Professor Spiro, der den Autopsien oft beiwohnte, machte mich wiederholt auf die Ähnlichkeit mit dem Sektionsbefund nach Wittepeptoninjektionen aufmerksam.

Daß es sich um eine örtliche Wirkung auf die Gefäßwände handelt, geht auch aus folgendem hervor:

Wenn man einen Tropfen eines Preßsaftes in den Conjunctivalsack träufelt, so tritt je nach der intensiven Wirkung der Flüssigkeit mehr oder weniger rasch, meist nach wenigen Sekunden, eine deutliche Erweiterung der Conjunctivalgefäße auf; nach kurzer Zeit ist die ganze Conjunctiva stark gerötet und es entsteht starkes Tränen. Der in das andere Auge des Kaninchens gegebene Tropfen physiologischer Kochsalzlösung bewirkt eine geringe vorübergehende Gefäßerweiterung. Die durch Preßsäfte hervorgerufene Gefäßerweiterung bleibt mehrere Minuten bestehen und geht dann ganz langsam zurück. Der Erfolg ist derselbe, ob man Preßsäfte von Ovarium, Corpus luteum oder Uterus nimmt. Am zweckmäßigsten wird konzentrierter Preßsaft gewählt. Dieselbe Wirkung haben auch die Extrakte und Fällungen mit Alkohol, Ather usw. Dagegen haben kalt hergestellte Extrakte keine gefäßerweiternde Wirkung. Für die Wirkung ist es natürlich gleichgültig, ob man tierisches oder menschliches Material nimmt. Die gefäßerweiternde Substanz wird durch Kochen nicht zerstört, ebensowenig wie die Blutdrucksenkung dadurch beeinflußt wird.

## B. Sonstige Wirkungen.

### Puls.

Eine deutliche Pulsverlangsamung pflegt bei starker Erniedrigung des Blutdruckes nicht zu fehlen, wenn sie auch nicht immer nach den ersten Injektionen eintritt. Sie dauert nur kurze Zeit an, ist aber manchmal während des Abfalls des Blutdruckes sehr ausgesprochen. Ob diese vorübergehende Pulswirkung der blutdruckherabsetzenden Substanz zuzuschreiben ist, bleibt zweifelhaft.

Der Einfluß auf die Atmung ist nicht immer konstant. Im allgemeinen kommt erst nach einigen Dosen eine wesentliche Verlangsamung der Atmung zustande, dann aber zuweilen sehr stark.

So betrug z. B. in einem Versuch die Atmung vor Beginn der Injektion 160 in der Minute; nach der zweiten Injektion (im ganzen wurden 0,6 ccm konz. Uteruspreßsaft injiziert) ging sie auf 110, nach der dritten Injektion (0,2 ccm) auf 100 und nach der fünften Injektion auf 64 pro Minute herunter: dabei war der Puls wenig beeinflußt worden und von 272 nur auf 240 heruntergegangen.

Mit dem Anstieg des Blutdruckes geht auch die Atmung wieder in die Höhe, um dann durch eine eventuelle spätere Injektion rascher als vorher zu sinken. Im allgemeinen kann man sagen, daß erst nach einer gewissen Menge wirksamer Substanzen eine Verlangsamung der Atmung eintritt. Ist aber einmal eine deutliche Verlangsamung der Atmung zustande gekommen, dann tritt sie bei einer weiteren wirksamen Dosis sofort wieder auf, und dann zuweilen sehr stark. Wenn das Tier unter einer starken Blutdrucksenkung steht, dann ändert sich oft der Atemtypus; die Atemzüge werden sehr mühsam, stoßweise und unregelmäßig; dies ist besonders einige Zeit vor dem Exitus der Fall.

Bemerkt sei weiter, daß sich öfters nach der intravenösen Injektion Rötung der Conjunctiven einstellt; in solchen Fällen fehlt auch Tränenfluß nicht. Daneben kann Speichelfluß bestehen.

In manchen Fällen treten auch Darmcontractionen auf; die Dickdarmwellen können besonders deutlich sein. Harn- und Kotentleerung sind nicht regelmäßig vorhanden; Anurie wurde nie beobachtet.

Es ist fraglich, ob diese Wirkungen auf die blutdruckherabsetzende Substanz oder auf Beimengungen zu beziehen sind. Das gleiche gilt in noch höherem Maße von den starken toxischen Wirkungen, den Krämpfen mit nachfolgendem Tod, wie sie von Lambert<sup>1)</sup>, Villemin<sup>2)</sup>, Ferroni<sup>3)</sup> gesehen worden sind.

---

<sup>1)</sup> Compt. rend. Soc. Biol. 1907, 18.

<sup>2)</sup> l. c.

<sup>3)</sup> Annali di ostetr. e ginecol. 1907.



In meinen Versuchen kamen sie so selten und so unregelmäßig zur Beobachtung, daß ich ihren Zusammenhang mit der typischen Blutdruckwirkung für durchaus unsicher halte, daher auch nicht näher darauf eingehe.

#### IV.

##### Chemische Eigenschaften der depressorischen Substanz.

Da ich Versuche einer Reindarstellung bisher nicht ausgeführt habe, kann ich nur zusammenfassend nach meinen gelegentlichen Beobachtungen folgendes über das chemische Verhalten der depressorischen Substanz sagen: Sie ist in physiologischer Kochsalzlösung löslich, ebenso in verdünntem und starkem Alkohol, geht jedoch aus den zerkleinerten Organen nur schwierig in kalte wässrige und alkoholische Lösung über; doch ist sie in Äther, Petroläther, Benzol, Aceton und Essigäther nicht unlöslich.

Am leichtesten läßt sich dies folgendermaßen nachweisen: Der im Vakuum gewonnene Alkoholrückstand (s. o.) wird im Mörser mit einer der genannten Flüssigkeiten energisch vermischt, die Extraktionsflüssigkeit immer wieder erneuert, bis zur völligen Farblosigkeit; die Gesamtmenge des so gewonnenen Extraktes wird im Vakuum eingetrocknet und dann wieder, wie oben, in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und filtriert. Ebenso kann man das möglichst konzentrierte alkoholische Extrakt mit Äther oder Aceton usw. im Überschuß fällen und dann abfiltrieren, das Filtrat eindunsten lassen und nun den Rückstand in physiologischer Kochsalzlösung wieder aufnehmen.

Die Substanz ist thermostabil. Swale-Vincent hat bereits mit Dekokt von Ovarium starke Blutdrucksenkung erzielt. Nach meinen Erfahrungen verliert die Substanz durch stundenlanges Kochen mit Wasser und durch anhaltende Behandlung mit kochendem Alkohol ihre Wirkung nicht. Sie wird durch Neutralisation der nativ meist schwach sauren Lösung nicht verändert. Hingegen scheint andauerndes Erwärmen mit HCl in alkoholischer Lösung ihre Wirkung aufzuheben, wenigstens wurde durch Extraktion von Uterus oder Ovarien mit salzsäurehaltigem Alkohol ein leicht pressorisch wirkendes Agens gewonnen.

Die depressorische Substanz ist nicht durch Jodjodkalium und nicht durch Jodwismutkalium fällbar, ebensowenig in wässriger oder alkoholischer Lösung durch Platinchlorid- und

**Chlorcadmiumlösung.** Nach Fällung der alkoholischen Organextrakte mit alkoholischer Chlorcadmiumlösung ließ sich die Substanz im Filtrat durch ihre Wirkung nachweisen.

Nach diesem Verhalten kann man die depressorische Substanz nicht den Proteiden, nicht den Alkaloiden und wohl auch nicht den Basen der Cholingruppe zuzählen. Möglicherweise steht sie jedoch den Substanzen nahe, die unter der vorläufigen Bezeichnung Lipide zusammengefaßt werden.

## V.

### Vergleich mit den blutdruckerniedrigenden Stoffen anderer Organe.

Aus den Versuchen von Swale-Vincent und Sheen und Vincent und Cramer geht hervor, daß die aus Nervengewebe erhaltlichen depressorisch wirkenden Extrakte zum mindesten zwei depressorisch wirksame Stoffe enthalten, erstens einen leicht in Alkohol löslichen, dessen Wirkung durch Atropin aufgehoben wird, zweitens einen in kaltem, nicht aber in heißem Alkohol ößlichen, dessen Wirkung von Atropin nicht beeinflußt wird. Möglicherweise findet sich daneben noch eine dritte in Alkohol lösliche durch Atropin nicht beeinflufßbare Substanz. Ähnliche Verhältnisse dürften, soweit das untersucht worden ist, jene Organe bieten, die eine depressorische, aber nicht durch Atropin ganz aufhebbare Wirkung entfalten. Bei der erstgenannten leicht in Alkohol löslichen Substanz dürfte es sich um Cholin oder eine ihm sehr ähnliche Substanz handeln. Für Thymus, Milz, Lymphdrüsen ist in der Tat seine Anwesenheit von v. Fürth und Lederer, für Schilddrüse von v. Fürth und C. Schwarz nachgewiesen.

Nach dem chemischen und physiologischen Verhalten zu schließen hat aber die blutdrucksenkende Substanz des weiblichen Geschlechtsapparates nichts mit Cholin zu tun. Vielmehr entspricht sie in ihrem Verhalten, soweit aus den spärlichen Anhaltspunkten ein Schluß gestattet ist, der zweiten Substanz, die in heißen Alkohol übergeht, kochbeständig ist und ihre Wirkung durch Atropin nicht einbüßt. Dies ist von Bedeutung für die Frage, ob man sie als eine für das Ovarium spezifische Substanz auffassen darf oder nicht. Das Gesagte spricht gegen diese Annahme. Man muß sich aber vor Augen

halten, daß eine derartige „spezifisch“ chemische Natur für die funktionelle Bedeutung nicht von entscheidendem Werte ist, da eine Substanz, wenn sie auch noch so verbreitet ist, doch in einem bestimmten Organe eine spezifische Aufgabe haben kann, wie z. B. Calciumphosphat im Knochensystem, die Lipoidphosphatide, die keiner Zelle fehlen, für das Nervensystem u. dgl. m.

## VI.

### Die Beziehungen der depressorischen Substanz zur Sexualfunktion.

Es ergibt sich nunmehr die Frage, ob der depressorischen Substanz des weiblichen Sexualapparates eine Bedeutung für die Geschlechtsfunktionen zugeschrieben werden kann.

Aus dem oben Berichteten geht hervor, daß die Corpora lutea selbst und die Ovarien nach Herausnahme der Corpora lutea in ihrer Blutdruckwirkung nicht verschieden sind. Dazu kommt, daß die Follikelflüssigkeit als solche sich stets als unwirksam erwies. Die wirksame Substanz dürfte sich sonach in den geformten Elementen der Corpora lutea, aber auch in den noch nicht fertigen Graafschcn Follikeln, also in den Granulosazellen, aus denen später die Luteinzellen hervorgehen, vorgebildet finden. Wenn das richtig ist, so ist zu erwarten, daß die Eierstöcke, auch wenn sie noch keine reife Follikel und Corpora lutea besitzen — also vor der Pubertät —, die blutdruckherabsetzende Substanz enthalten, nicht aber wenn der Follikelapparat erschöpft ist — nach der Menopause.

Diese Vorstellung hat sich bei Untersuchung von Ovarien junger noch nicht geschlechtsreifer Tiere einerseits, von Organen älterer Frauen jenseits der Menopause andererseits bestätigt gefunden. Die blutdruckherabsetzende Substanz fand sich genau wie das Antithrombin schon vor der Pubertät (Fig. 8 u. 9), fehlte aber nach der Menopause (Fig. 10 u. 11).

Sie findet sich aber ebenso im Menstrualblut.

Die Schwierigkeit, genügende Mengen Menstruationsblut zur Untersuchung zu erhalten, konnte umgangen werden, als nachgewiesen war, daß das depressorische Agens in Alkohol übergeht.

Es wurden dann von Individuen, welche wegen profusen Menstruationen das Bett hüten mußten, sämtliche Wattevorlagen in 95%igem

Alkohol aufbewahrt und die mit Blut durchtränkten Wattebäusche mit kochendem Alkohol extrahiert. Der Alkohol wurde immer wieder erneuert, bis er sich so gut wie nicht mehr färbte. Es bedurfte zu dieser Extraktion

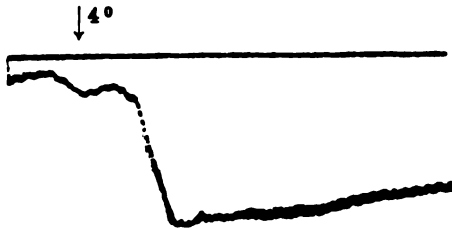


Fig. 8. 1 ccm alkohol. Extrakt von Uterus (Kalb).

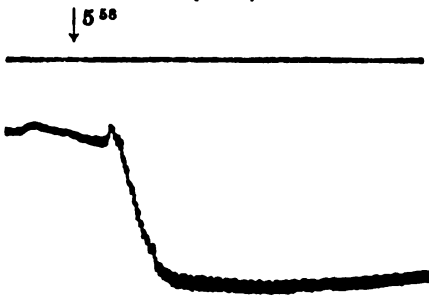


Fig. 9. 5 50 1 ccm alkohol. Extrakt von Ovarium (Kalb).

ziemlich großer Mengen von Alkohol, die später bis auf einen kleinen Rest überdestilliert wurden. Der Rest wurde im Vakuum getrocknet und dann mit der eben notwendigen Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und filtriert. Dieses Extrakt wurde dann intravenös injiziert mit ausgesprochenem Erfolg (vgl. Kurve 12). Die eintretende Depression war meistens tief und langdauernd, die Pulsverlangsamung fehlte fast nie, der Einfluß auf die Atmung zuweilen.

Das Extrakt von Menstruationsblut wirkt etwas toxischer als dasjenige von Ovarium oder Uterus. Die Zuckungen waren nach diesen Injektionen manchmal auffallend häufiger, ohne

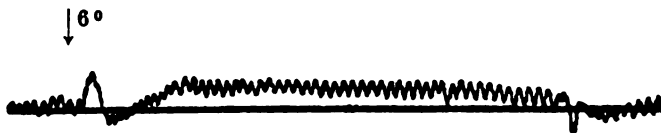


Fig. 10. 2 ccm alkohol. Extrakt von Uterus (Menopause).



Fig. 11. 1 ccm alkohol. Extrakt von Ovarium (Menopause).

daß dadurch der Verlauf der Kurve wesentlich beeinflusst wurde. In 2 Fällen trat kurz nach der Injektion plötzlich der Tod ein; ob das Extrakt allein hieran schuld war, muß dahingestellt bleiben.

Auch dem Adrenalin, Pituitrin und Atropin gegenüber gilt das vom Ovariumextrakt Gesagte. Es wurden mehrfache Kontrollversuche mit ebenso hergestelltem Extrakt von Rinder- und Kälberblut angestellt um zu prüfen, ob Blutextrakt an sich etwa depressorische Wirkung besitzt. Durch die Injektion dieser Extrakte wurde jedoch der Blutdruck nicht beeinflusst.



Fig. 12. 1 ccm alkohol. Extrakt von Menstruationsblut.

Es kann danach kaum zweifelhaft sein, daß der Uterus ebenso wie die gerinnungshemmende auch die blutdruckherabsetzende Substanz an das Menstruationsblut abgibt. Hingegen ist damit trotz aller Ähnlichkeit der Wirkung nicht bewiesen, daß die depressorische Substanz des Uterus aus dem Ovarium stammt. Es ist sehr verlockend sich vorzustellen, daß das Ovarium die blutdruckherabsetzende Substanz während der Geschlechtsreife bereitet und allmählich an den Uterus abgibt, und daß dann die lokal gefäßerweiternde Substanz Hyperämie und periodische Schwellung der Uterusschleimhaut hervorbringt, wodurch diese zur Aufnahme des vom Ovarium ausgestoßenen Eies fähig wird. Die Beobachtung von Marshall und Jolly<sup>1)</sup>, daß Extrakte von brünstigen Tierovarien bei subcutaner Injektion Erscheinungen von Brunst (Hyperämie, Schwellung, Blutabgang) hervorrufen, spricht sehr für eine solche Vorstellung. Ich habe dieses Verhalten auch für

<sup>1)</sup> Das Ovarium als innersekretorisches Organ. Philosoph. transact. of the royal society of London. B. 198.

die Uterus- und Ovarialextrakte vom Menschen und Tier nachweisen können, und zwar selbst bei kastrierten Tieren<sup>1)</sup>.

Es muß demnach die Möglichkeit, daß die im Ovarium gebildeten und in das Blut abgegebenen Stoffe eine solche Wirkung im Uterus erzeugen können, entschieden zugegeben werden. Damit gewinnt die obige Vorstellung außerordentlich an Wahrscheinlichkeit und es bleibt nur dunkel, auf welchem Wege die betreffenden Hormone vom Ovarium zum Uterus gelangen. Daß dies durch die Blutbahn geschieht, kann nicht bezweifelt werden, wenn es auch nicht gelingt, diese Stoffe im Blute der Frauen vor und während der Menstruation nachzuweisen und ebensowenig bei ihnen zu irgendeinem bestimmten Zeitpunkt einen abnorm niedrigen Blutdruck oder eine verminderte Gerinnbarkeit ihres Körperblutes festzustellen. Immerhin erscheint dies verständlich. Es darf wohl angenommen werden, daß sich ein solcher Transport durch das Blut so allmählich vollzieht, daß sich eine Wirkung auf den allgemeinen Blutdruck nicht geltend machen kann. Daß aber die gefäß-erweiternde Substanz in den allgemeinen Kreislauf übergeht und hier ihre Wirkung, wenn auch in andern Gefäßgebieten, ausüben kann, beweist das Auftreten von vicariierenden Blutungen.

Wenn diese Auffassung richtig ist, darf man die blutdruckherabsetzende und die gerinnungshemmende Substanz des Ovariums als physiologisch wichtige Produkte der inneren Sekretion der Ovarien, also als Hormone ansprechen. Aller Wahrscheinlichkeit nach werden noch andere spezifische Stoffe im Ovarium gebildet, solche z. B., welche zum Knochenwachstum, zur Entwicklung des Körpers überhaupt, zum Stoffwechsel (Fettauf- und -abbau) usw. in Beziehung stehen. Auch die mannigfachen nervösen und sonstigen Störungen, die bei vielen Frauen die Menstruation begleiten, dürften sich wohl durch eine in diesem Stadium entstehende Anhäufung von Hormonen oder mehr oder weniger toxischen Stoffwechselprodukten des Genitalsystems auffassen lassen.

---

<sup>1)</sup> Vgl. Diskussionsbemerkung zum Referat von Biedl über die innere Sekretion. Naturforscher-Versammlung Karlsruhe 1911.

Die neueren experimentellen Untersuchungen haben jenen Teil der Fränkelschen Theorie bestätigt, der sich auf die Beeinflussung der Gravidität durch das Corpus luteum bezieht. Daß die Beherrschung der Geschlechtsvorgänge auch beim nicht graviden Individuum vom Corpus luteum aus erfolgt, ist nach eigenen (später zu veröffentlichenden) Beobachtungen und denen anderer Autoren (Marshall und Jolly, l. c.) nicht haltbar. Auch meine obigen Erfahrungen sprechen nicht für eine besondere Wirksamkeit der Corpora lutea außerhalb der Gravidität. Hingegen lassen sie sich mit der Vorstellung, daß das Drüsengewebe des Eierstocks auf die Entwicklung des Uterus und den Vorgang der Menstruation einen entscheidenden Einfluß ausübt, gut in Einklang bringen.

---

# Zur Lehre von der inneren Sekretion der Placenta.

Von

G. Schickele.

(Ausgeführt mit Unterstützung der Cunitz-Stiftung.)

(Aus dem physiologisch - chemischen Institut und der Frauenklinik der  
Universität Straßburg i. E.)

(Eingegangen am 29. November 1911.)

Mit 6 Figuren im Text.

## I.

Aller Wahrscheinlichkeit nach besitzen die meisten Organe eine Art innerer Sekretion, d. h. es entstehen in dem spezifischen Stoffwechsel Substanzen, die nach außen abgegeben werden, ehe sie zu Endprodukten abgebaut worden sind, und die dann, sei es wegen ihres Nährwertes oder ihrer physiologischen Wirksamkeit, noch in andern Organen Verwendung finden. Der Bau der Placenta legt es nahe, daß auch ihr eine innere Sekretion zukommt, für deren funktionelle Bedeutung vor einigen Jahren namentlich Halban mit aus der geburtshilflichen Erfahrung geschöpften Gründen eingetreten ist (Arch. f. Gyn. 75). Er verlegt die Quelle der aktiven Schwangerschaftssubstanzen in die Placenta bzw. in den Trophoblast und das Chorionepithel. Nach Halban lösen Placentarstoffe den ersten Wachstumsimpuls der Brustdrüse bei Mutter und Kind aus und üben weiter ganz ähnliche Wirkungen aus wie die, die von dem Ovarium stammen, nur energischer. Ovarium und Placenta ist die Fähigkeit gemeinsam, Hyperämie und Hämorrhagien zu erzeugen; auch die toxischen Nebenwirkungen der ovariellen und placentaren Substanzen stellt Halban auf dieselbe Stufe, ebenso das Verhältnis dieser Organe zur Thyreoidea. Er führt



diese Parallele noch weiter durch und nimmt an, daß während der Gravidität die Placenta die protektive Funktion des Ovariums übernimmt, wobei er voraussetzt und auch zu beweisen sucht, daß die Funktion des Ovariums während der Gravidität sistiert. Endlich erblickt er in dem Fortfall der Placenta (nach Beendigung der Geburt) das wirksame Moment für das Auftreten der Milchsekretion. Dieser Auffassung zufolge würde allerdings die Placenta vermöge ihrer inneren Sekretion eine ganz bedeutende Rolle in dem Organismus spielen. Inwieweit diese Ansicht auf Gültigkeit Anspruch erheben darf, soll hier nicht erörtert werden. Für die nachfolgend mitzuteilenden Versuche kommt nur die von Halban ausgeführte Vorstellung in Betracht, wonach Placenta und Eierstöcke analoge Wirkungen auf Blut und Kreislauf ausüben sollen.

Da ich mich mit den Wirkungen von Ovarialextrakten näher beschäftigt hatte, schien es mir wünschenswert, festzustellen, ob auch die Placentarextrakte ähnliche Wirkungen entfalten. Ich habe dabei vor allem die gerinnungshemmende und blutdruckherabsetzende Wirkung ins Auge gefaßt.

## II.

### Die Gerinnungswirkung der Placenta.

Wie bereits Savarè im hiesigen physiologisch-chemischen Institut gezeigt hat (Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 9), enthält das Placentargewebe ein Agens, das die Blutgerinnung beschleunigt. Es ist nicht schwer, diese Angaben zu bestätigen. Ich habe mich dabei der Vergleichbarkeit halber, wie bei den Untersuchungen der Ovarialextrakte und Preßsäfte, des Gänseplasmas bedient.

Frisches Gänseplasma, das sich selbst überlassen stundenlang ungeronnen bleibt, gerinnt auf Zusatz von Placentarpreßsaft ebenso wie auf Zusatz von Muskelpreßsaft.

#### Versuch vom 9. XI. 09 (Auszug).

IV. 1. 0,4 ccm Gänseplasma + 0,4 ccm Preßsaft vom M. pectoralis: nach 37 Min. geronnen;

2. 0,2 ccm Gänseplasma + 0,2 ccm Preßsaft einer menschlichen Placenta + 0,6 ccm physiol. Kochsalzlösung: nach 25 Min. geronnen;

3. 0,4ccm Gänseplasma + 0,4ccm Preßsaft einer menschlichen Placenta: nach 29 Min. geronnen.

Durch Behandeln mit kochendem Alkohol geht die gerinnungsbefördernde Wirkung nicht verloren. Die wirksame Substanz geht in Alkohol und Äther über.

1. Gänseplasma 15 Tropfen: am nächsten Tage noch ungeronnen;

2. Gänseplasma 15 Tropfen + Blutserum (Rind) 15 Tropfen: nach 23 Min. geronnen;

3. Gänseplasma 15 Tropfen + Placenta (Alkoholfraktion) 15 Tropfen: nach 76 Min. geronnen.

4. Gänseplasma 15 Tropfen + Placenta (Ätherfraktion) 15 Tropfen: nach 29 Min. geronnen.

Nach diesen Versuchen zu schließen, enthält die Placenta eine antithrombinähnliche Substanz, wie sie sonst im weiblichen Genitalapparat verbreitet ist, entweder überhaupt nicht oder doch nur in so geringer Menge, daß ihre Wirkung von der gerinnungsbefördernden Substanz verdeckt wird. Daß diese thrombin- oder kinaseartig wirkende Substanz ein Ferment im gewöhnlichen Sinne ist, wird durch ihre relative Thermostabilität sehr zweifelhaft gemacht.

### III.

#### Die Wirkung der Placentalstoffe auf den Blutdruck.

Die intravenöse Injektion von Placentalpreßsaft oder -extrakt ruft eine deutliche und langdauernde Blutdrucksenkung hervor (vgl. Kurven 1, 2 und 3).

Die Darstellung der Preßsäfte geschah in der bekannten, in der vorigen Mitteilung erwähnten Art. Die Extrakte wurden in folgender Weise gewonnen: Die von Eihäuten und Nabelschnur befreiten Placenten wurden in der Fleischhackmaschine zerkleinert, im Vakuum samt der ausgeflossenen Flüssigkeit getrocknet, zermahlen und dieses Pulver dann mit kochendem Alkohol mehrfach bis zur Farblosigkeit extrahiert; der Alkohol wird eingeeengt, verdunstet, der schmierige Rückstand in physiol. Kochsalzlösung aufgenommen, diese alkoholische Fraktion filtriert und injiziert; oder der Rückstand wird in Äther aufgenommen, im Mörser zerrieben, der abfiltrierte Äther verdunstet, der Rückstand in physiol. Kochsalzlösung aufgenommen und diese Flüssigkeit (ätherlösliche Fraktion) filtriert und injiziert.

In einer Anzahl von Fällen wurden die in der Fleischhackmaschine zerkleinerten Placenten einige Stunden im strömenden Wasser belassen,

bis sie möglichst blutleer waren (noch anhaftende makroskopisch sichtbare Gerinnsel wurden sorgfältig entfernt) und dann nach Trocknung wie oben extrahiert. Ein wesentlicher Unterschied in der Wirkung der Extrakte aus blutleeren und bluthaltigen Placenten ergab sich nicht; vielleicht war die Wirkung der entbluteten Placenten etwas nachhaltiger.

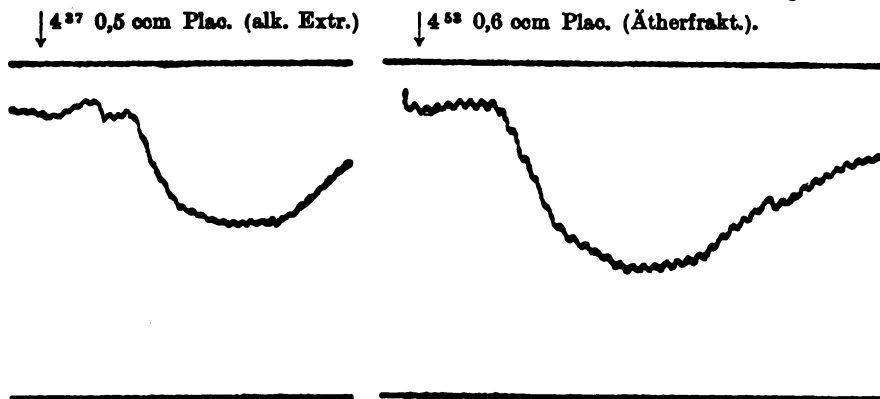


Fig. 1.



Fig. 2.

↓ 6<sup>14</sup> 1 ccm alkohol. Placentarextrakt.  
(Placenta von Blut befreit).



Fig. 3.

Intensiv wirkende Extrakte der Placenta kann man durch mehrstündiges Ausschütteln mit Äther erhalten (vgl. Kurve 5), nachheriges Verdunsten des Äthers und Behandlung wie oben.

Die blutdruckherabsetzende Wirkung kommt auch dem Placentarblut zu.

Wenn man eine frischgeborene Placenta mit unterbundener Nabelschnur in eine Schale legt und das spontan aussickernde Blut auffängt, trocknet, pulverisiert, mit Alkohol extrahiert und in der gewöhnlichen Weise weiter behandelt, so wird man bei der intravenösen Injektion dieses Extraktes eine deutliche Blutdrucksenkung auftreten sehen (s. Kurve 4).

↓ 6<sup>86</sup> 1 com alk. Extr. Placentarblut.



Fig. 4.

Das zum Vergleich herangezogene Blut des retroplacentaren Hämatoms verhält sich etwas anders; es ist mit einem entsprechend hergestellten Extrakt nicht immer eine Blutdrucksenkung zu erzielen; eine gerinnungshemmende Wirkung konnte ich mit demselben Extrakt nicht feststellen.

In derselben Weise hergestelltes Nabelschnurblut ist imstande, eine Blutdrucksenkung hervorzurufen, aber nicht die Blutgerinnung zu verhindern.

In der Wirkungsweise unterscheidet sich anscheinend das depressorische Agens der Placenta also nicht von jenem der Ovarien. Seine Wirkung wird nicht durch Atropin aufgehoben. Es vermag, auf die Conjunctiva gebracht, hier Rötung hervorzurufen.

In der Literatur ist über die Wirkung von Placentaextrakten auf die Gerinnung oder auf den Blutdruck wenig bekannt. Neu<sup>1)</sup> beobachtete, „daß die Blutgerinnung nach

<sup>1)</sup> Münch. med. Wochenschr. 50, 1909.

Zusatz von 0,4 ccm Decidua- oder Placentarextrakt (physiol. Kochsalzlösung) fast schlagartig eintrat und fast sofort komplett war, während die durchschnittliche Gerinnungszeit vom normalen Menschenblut bei 18 bis 20 Min. liegt“. Nicht zuletzt sieht N. in dieser Tatsache eine Bedeutung für die Blutstillung nach Entfernung der Placenta. Neu<sup>1)</sup> fand ferner im Durchströmungsversuch nach Lāwen-Trendelenburg stark vasodilatatorisch wirkende Substanzen in der Placenta, und zwar besonders, wenn mit völlig blutfreiem und frischem Ausgangsmaterial gearbeitet werden konnte. Einen solchen wesentlichen Unterschied zwischen bluthaltigen und blutleeren Placenten konnte ich, wie oben erwähnt, nicht feststellen. Dixon und Frank E. Taylor<sup>2)</sup> haben frische menschliche Placenten mit absolutem Alkohol extrahiert, das Extrakt zur Trockne eingedampft, den Rückstand in physiol. Kochsalzlösung aufgenommen und intravenös injiziert. Dabei beobachteten sie eine Blutdrucksteigerung genau wie nach Injektion von Adrenalin. Derartige Wirkungen habe ich nie gesehen, weder mit Preßsäften noch mit Extrakten der Placenta. — Ausführlich mitgeteilte Versuche sind mir weiter nicht bekannt geworden.

#### IV.

Von weiteren physiologischen Wirkungen der Placentarextrakte bzw. -preßsäfte konnte ich folgendes beobachten: Durch die intravenöse Injektion von Placentarextrakt wird Puls und Atmung weniger beeinflußt, als dies bei Ovarialextrakten der Fall ist, vor allem wesentlich weniger, als durch Injektion von Menstruationsblutextrakt. Eine deutliche Pulsverlangsamung habe ich nur einmal gesehen (Kurve 5): der Puls ging parallel mit der Blutdrucksenkung rasch von 180 auf 96 Schläge in der Minute herab, während die Atmung unverändert blieb. Bemerkenswert sind die großen Ausschläge des Pulses.

Die Atmung war nach wiederholten Injektionen von Placentarextrakt einige Male auffallend mühsam und geräuschvoll, ohne aber an Zahl sich zu verändern.

---

<sup>1)</sup> Münch. med. Wochenschr. 34, 1911.

<sup>2)</sup> VII. internat. Physiol. Kongr. Heidelberg 1907.

Eine besondere toxische Wirkung wurde mit diesen Extrakten nicht beobachtet. Die Versuchstiere zeigten nicht so

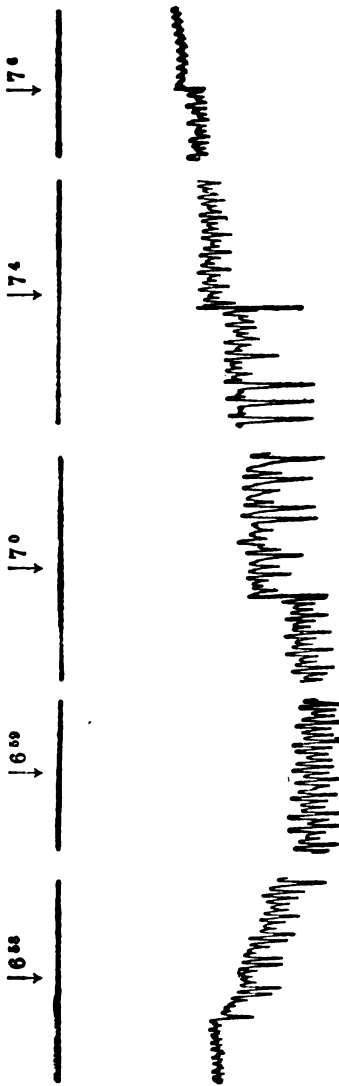


Fig. 5. 657 2 ccm Ätherschüttelextrakt, menschl. placenta (Versuch 34).

oft Unruhe und Zuckungen als jene mit Ovarialextrakten injizierten; sie haben sich — bis auf ein Tier — von dem Eingriffe gut erholt. Zwischen den aus der Literatur bekannten Beobachtungen und den meinigen besteht also ein merklicher Unterschied, offenbar der Verschiedenheit der Extraktion entsprechend. Den Arbeiten von Rich. Freund, Weichardt, P. Mathes, Engelmann u. Stade, Schenk, Guggisberg u. a. gegenüber kann ich nur sagen, daß die von diesen Autoren gesehene toxischen Wirkungen zum größten Teil verschwinden bei Extraktion der Placenta mit Alkohol oder Äther (Petroläther, Aceton u. a.). Dagegen geht die gerinnungserzeugende Fähigkeit der (fötalen) Placenta bei dieser Extraktion nicht verloren. Diese gerinnungserregende Substanz, die vermutlich bei der Eklampsie eine Rollespielt, ist also thermo-

stabil, sie ist aber mit der gefäßerweiternden Komponente nicht identisch, denn wir finden letztere z. B. auch im Ovarium, Corpus luteum und Uterus, deren Extrakte die Gerinnung hemmen. In der Placenta kommen also mehrere physiologisch

wirksame Substanzen vor: eine gerinnungsbefördernde, eine gefäßerweiternde, die beide nicht als Fermente im gewöhnlichen Sinne des Wortes gelten können, außerdem kann noch von giftig wirkenden Stoffen die Rede sein, den Arbeiten der zitierten Autoren entsprechend. In welcher Weise diese toxischen Substanzen für den mütterlichen (oder fötalen) Organismus von Bedeutung sein können, kann m. E. noch nicht beurteilt werden. Es fehlt vor allem der Beweis, daß solche Stoffe — seien sie nun Fermente oder nicht — in den Kreislauf gelangen, für den Körper überhaupt von Bedeutung sind. Die Erfolge von Engelmann und Stade können in diesem Sinne als beweisend nicht angesehen werden (vgl. die Hirudinversuche von Guggisberg). Der Nachweis von Fermenten in der Placenta sagt noch nicht, daß diese Fermente in das mütterliche Blut abgegeben werden, und selbst wenn dies der Fall, dann ist der Zusammenhang mit der Entstehung der Eklampsie (Hofbauer) noch nicht nahegelegt.

Ein anaphylaktischer Zustand kann durch mehrfache intravenöse Injektionen meiner Placentarextrakte nicht erzeugt werden; nach Vorbehandlung mit Extrakt wurde bei mehreren Tieren ein Blutdruckversuch angestellt, wie oben beschrieben; der Blutdruck solcher Tiere war bei Beginn des Versuches normal; auf die verschiedenen Injektionen traten gerade wie bei den nicht vorbehandelten Tieren charakteristische Senkungen auf, anaphylaktische Phänomene aber nie. Ich habe mit dieser kurzen Beschreibung schon hervorgehoben, daß auch eine Immunität gegen diese Extrakte nach Vorbehandlung nicht auftritt; sie besteht ebensowenig primär.

## V.

### Die Beziehung der blutdruckherabsetzenden Substanz der Placenta zu anderen Organen.

Wie aus obiger Darstellung hervorgeht, stimmt die blutdruckherabsetzende Substanz der Placenta in ihrem chemischen und physiologischen Verhalten, soweit dies untersucht ist, mit jener der Ovarien, des Uterus und des Menstruationsblutes überein, so daß man an eine Identität denken muß. Bei den engen Beziehungen des Embryo zur Placenta war daran zu denken, daß auch im Körper des Embryo die gleiche Substanz

nachweisbar sein könnte. Diese Vermutung hat sich bestätigt. Frisch ausgestoßene Embryonen von Kaninchen, Hund, Rind und Mensch (Aborte aus dem 2. bis 3. Monat) wurden zerkleinert, getrocknet, mit Alkohol oder Äther extrahiert und wie die oben genannten Organe behandelt. Die intravenöse Injektion solcher Embryonenextrakte rief stets eine Blutdrucksenkung hervor (vgl. Kurve 6); es genügten hierzu schon kleine Dosen. In einem Falle (vaginale Exstirpation des graviden Uterus im 3. Monat wegen Phthisis pulmonum) wurde das ganze Ei (Chorionsack + Fötus) zerkleinert und extrahiert. Dieser Extrakt hatte natürlich eine ebenso deutliche Blutdrucksenkung zur Folge.

↓ 5<sup>36</sup> 1 ccm alkohol. Extrakt von Embryonen (Hund).

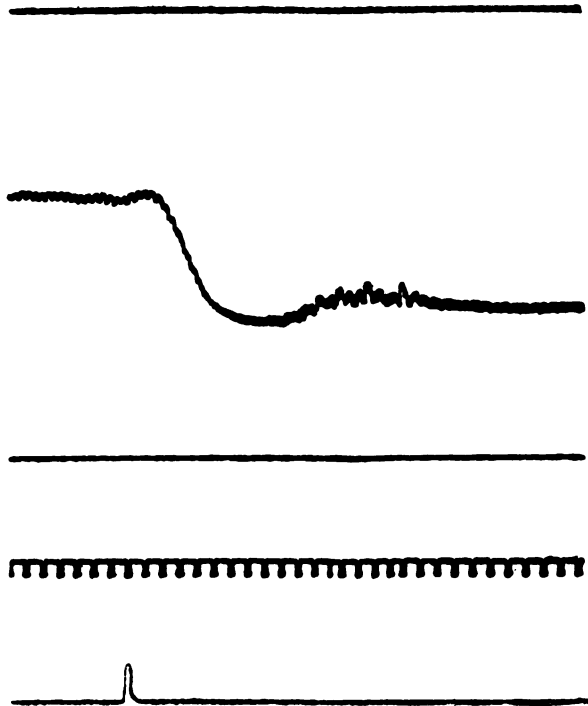


Fig. 6.

Wie in der vorigen Abhandlung ausgeführt, kann die blutdruckerniedrigende Substanz nicht mit Sicherheit als ein bloß dem Ovarium zukommender Bestandteil angesehen werden, wenn



dies auch nicht eine spezifische Wirkung dieser Stoffe für die Sexualfunktionen ausschließt. Das Vorkommen in den Embryonen gibt in dieser Richtung keine Entscheidung. Ist man geneigt anzunehmen, daß die im Uterus vorkommende blutdruckherabsetzende Substanz aus dem Ovarium stammt, dann ist ein Übertritt dieser Substanz aus der Uteruswand in die Placenta und von da in den Embryo ohne Schwierigkeiten zu verstehen. Allein bei dem Vorkommen solcher Substanzen in andern Geweben muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß sie im Embryo unabhängig vom Ovarium entstehen.

Die Placentarextrakte sind ferner imstande, die für Pituitrin (Hypophysisextrakt) charakteristische Blutdrucksteigerung zu verhindern, ebenso bei genügender Dosis die Adrenalinwirkung aufzuheben bzw. herabzusetzen.

Versuch 45: Durch mehrfache intravenöse Injektionen von Placentarextrakt war der Blutdruck des Versuchstieres auf 32 mm unterhalb des Anfangsdruckes gesunken; eine um 6<sup>h</sup> 11' gegebene Injektion von 0,6 ccm Pituitrin vermochte nicht die sonst prompt eintretende Blutdruckerhöhung hervorzurufen; weitere Injektionen hatten nicht mehr Erfolg.

#### Versuch 45.

Auf der Höhe einer durch 0,01 mg Adrenalin erzeugten Blutdrucksteigerung wurde 1 ccm alkoholischer Placentarextrakt injiziert. Es erfolgte sofort ein Abfall um 20 mm, der sich noch weiter bis 20 mm unter den Anfangsdruck vertiefte. Weitere Injektionen von 0,01 mg Adrenalin haben nur eine unbedeutende vorübergehende Erhebung des Blutdruckes zur Folge.

Also auch hierin eine Übereinstimmung mit den Ovarialextrakten. Endlich läßt sich eine solche auch dem alkoholischen Extrakt der Thyreoidea gegenüber feststellen: die depressorischen Wirkungen beider Organe (Thyreoida und Placenta) summieren sich, die Depression wird also stärker, wenn auch nur vorübergehend, der Thyreoideawirkung entsprechend, die ja wesentlich kürzere Zeit anhält als jene der Placenta und der Ovarien.

#### Schlußbemerkungen.

Der Nachweis von Stoffen in der Placenta, die einerseits Gerinnung, andererseits Gefäßerweiterung hervorrufen, läßt sich zur Beleuchtung bekannter histologischer Veränderungen innerhalb der Placenta verwerten. Es ist bekannt, daß man so

gut wie in jeder Placenta geronnenes Blut, Thrombosen in verschiedensten Stadien trifft. Es ist weiter bekannt, daß in der nächsten Umgebung solcher Thrombosen, sei es im maternen oder fötalen Teil der Placenta, Ektodermwucherungen oft vorhanden sind. Ob nun die Gerinnungen den primären Vorgang bilden und die Ektodermwucherungen erst sekundär auftreten, oder ob das Umgekehrte vorliegt (beides kommt vor): auf jeden Fall dürfen wir daraus den Schluß ziehen, daß zwischen Ektodermwucherungen und Blutgerinnung ein Zusammenhang besteht<sup>1)</sup>. Das Syncytium scheint nicht gerinnungsbefördernd zu wirken, denn wo intaktes Syncytium liegt, ist das Blut im allgemeinen flüssig; an von Syncytium entblößten Bezirken ist Gerinnung die Regel. Hier tritt dann das Blut in Kontakt mit den unterhalb des Syncytium liegenden Ektodermzellen (s. Langhanssche Zellen, Trophoblast). Also auch hier ist ein Hinweis für die Beziehung zwischen Ektodermzellen und Blutgerinnung gegeben. Eine weitere Bestätigung finden wir in den bekannten histologischen Bildern der Chorionepitheliome. Diese zeichnen sich durch häufige Blutungen aus und durch Gerinnung des ausgetretenen Blutes innerhalb der Gewebe. Solche Tatsachen werden verständlich, wenn wir uns vergegenwärtigen, daß die Ektodermzellen nicht nur arrodierende Eigenschaften der Gefäßwand gegenüber besitzen, sondern auch die Fähigkeit, Hyperämie d. h. Gefäßerweiterung und Blutgerinnung zu erzeugen.

Der Nachweis, daß die Placenta in bezug auf die blutdruckherabsetzende Substanz den Ovarien sehr ähnlich ist, könnte zur Unterstützung jenes Teiles der eingangs erwähnten Halbanschen Theorie dienen, wonach die Placenta die Funktionen der Ovarien zu verstärken, bzw. zu ersetzen imstande wäre. Doch liegen für eine gänzliche Übernahme der Funktion der Ovarien durch die Placenta genügende Anhaltspunkte nicht vor. Ohne in dem Nachweis bestimmter Substanzen in einem Organ schon einen Beweis für die Produktion dieser Substanzen durch das betreffende Organ erblicken zu wollen, möchte ich doch erwähnen, daß die depressorischen Stoffe während der Gravidität im Uterus, also auch im Ovarium, ebenso vorhanden

<sup>1)</sup> Vgl. Schiöckle, Die Chorionektodermwucherungen usw. Beiträge z. Geb. u. Gyn. 1905.

sind, wie außerhalb der Gravidität<sup>1)</sup>. Anatomische und physiologische Momente legen es außerdem sehr nahe, um nicht mehr zu sagen, daß die Funktion der Ovarien während der Gravidität nicht vollständig aufhört (Schatz, Fellner u. a.). Genaue Anhaltspunkte gibt es m. W. dafür noch nicht. Von den zwei physiologischen Wirkungen der Ovariextrakte, Gerinnungshemmung und Blutdruckherabsetzung, kommt der Placenta als Ganzes nur letztere zu; dem Blut gegenüber zeigt sie sogar entgegengesetztes Verhalten. Dies gilt aber vorwiegend für die fötalen Bestandteile der Placenta; das in der Placenta kreisende mütterliche Blut hindert die Gerinnung, wenn auch in etwas geringem Maße als das Menstruationsblut. Immerhin erscheint jetzt die Tatsache, daß das in die Placenta fließende mütterliche Blut zum größten Teile flüssig bleibt, durch den Nachweis eines Antithrombins besser verständlich. Das Blut muß aber flüssig bleiben, wenn es die Nährstoffe für den Embryo an Ort und Stelle befördern soll.

Die vasodilatatorische Wirkung kommt allen Komponenten der Placenta zu, dem mütterlichen und fötalen Blut, dem Chorionepithel und dem Embryo, wenn auch in verschiedener Intensität.

Es steht somit der Auffassung nichts im Wege, daß die Placenta, was ihre Beziehungen zum Blute und zur Blutgerinnung anbelangt, eine innere Sekretion besitzt; klinische Beobachtungen und experimentelle Untersuchungen geben hierfür gewisse Anhaltspunkte. Es ist weiter möglich, daß die Placenta, oder wenigstens Teile von ihr, auf diesem Wege Wirkungen entfalten können, die denen der Ovarien bis zu einem gewissen Grade an die Seite zu stellen sind. Von diesem Ergebnis bis zum Beweise einer inneren Sekretion ist aber ein weiter Weg, dessen Verlauf vorläufig noch in Dunkel gehüllt ist.

---

<sup>1)</sup> Dasselbe gilt für die gerinnungshemmenden Substanzen.

# Über die Giftwirkung von oxalsauren Salzen und die physiologische Funktion des Calciums.

Von

Oscar Loew (München).

(Eingegangen am 1. Dezember 1911.)

Während die Giftwirkung oxalsaurer Salze auf Wirbeltiere seit langem bekannt ist, ist die giftige Wirkung dieser Salze auf Pflanzen erst in neuerer Zeit beobachtet worden. Die erste kurze Notiz hierüber brachte Schimper<sup>1)</sup> mit folgenden Worten:

„Zweige von *Tradescantia Selloi* wurden in Lösungen von neutralem und saurem oxalsaurem Kali gebracht, in der Konzentration von 1, 2 und 3%. Sie gingen allmählich zugrunde, und zwar unter Bildung von braunen Flecken an den Blättern. Die sauren Lösungen wirkten viel energischer als die neutralen.“ Das ist alles. Hieraus kann aber offenbar kein sicherer Schluß gezogen werden, weil Konzentrationen von 1 bis 3% selbst bei sonst ganz unschädlichen Salzen für Phanerogamen schon so bedeutend sind, daß dadurch osmotische Störungen mit Plasmolyse eintreten können. Es wäre also ein Kontrollversuch mit anderen Salzen unbedingt erforderlich gewesen, um die Giftwirkung der Oxalate beurteilen zu können. Schimper schloß, daß Kalksalze dadurch eine wichtige Rolle ausüben, daß sie die im Stoffwechsel gebildete giftige Oxalsäure durch Ausfällung unschädlich machen. Die Frage aber, warum denn neutrale oxalsaure Salze giftig auf Pflanzen wirken, wurde von ihm garnicht erhoben. Und doch liegt gerade hierin das wichtige Problem der Calciumfunktion verborgen.

Jene Mitteilung Schimpers war für mich die Veranlassung zu Beobachtungen über die Wirkung von neutralem Kaliumoxalat auf Algen und niedere Wassertiere. Hierbei überraschte mich die eintretende Giftwirkung so, daß ich sie bei der Alge *Spirogyra* genauer verfolgte und hierbei eine auffallend rasche Contraction des Zellkernes beobachtete<sup>2)</sup>. Da diese hochinter-

---

<sup>1)</sup> Flora 1890, 249.

<sup>2)</sup> Flora 1892, 374.

essante Reaktion und ihre Bedeutung in sämtlichen neueren pflanzenphysiologischen Werken verschwiegen wurde, so habe ich meine Beobachtungen weiter vervollständigt und gebe im folgenden einen kurzen Überblick. Vorausgeschickt sei, daß stets reines umkrystallisiertes Dikaliumoxalat verwendet wurde. Zur Kontrolle diente eine äquimolekulare und einigemal auch eine gleich konzentrierte Lösung von Dikaliumtartrat<sup>1)</sup>.

#### Versuche an niederen Wassertieren.

In einer 0,1%igen Lösung von Dikaliumoxalat starben Asseln, Copepoden und Rotatorien in 3 bis 4 Stunden, Planarien nach 3 Tagen, während Ostracoden noch nach 8 Tagen lebend waren. Infusorien wie Vorticella und Paramecium, ferner grüne Flagellaten wie Euglena waren in dieser Lösung noch nach 3 Tagen lebend<sup>2)</sup>. In einer 0,2%igen Lösung des Salzes starben viele Infusorien in 21 Stunden, jedoch waren einige zu runden straffen Kugeln wie Cysten geballt und vielleicht noch lebend. Einige kleine Infusorien und Amöben wurden in einer Probe nach einem Tage noch am Leben gesehen, aber nach 50 Stunden war überall das Leben erloschen, und nur bei den niedersten Flagellaten war noch Bewegung vorhanden. In der Kontrolllösung mit 0,3% Dikaliumtartrat waren nach 50 Stunden sämtliche Infusorien und Rotatorien noch lebend.

In einer 0,5%igen Lösung von Dikaliumoxalat starben Infusorien, Asseln, Copepoden und Rotatorien in 30 bis 50 Min. ab, dann folgten Egel und Planarien, hierauf Insektenlarven und Ostracoden, während nach 24 Stunden noch lebten einzelne Wasserkäfer, Wassermilben und Nematoden. In der Kontrolllösung mit Tartrat waren nach 24 Stunden noch sämtliche Organismen am Leben, viele auch noch nach drei weiteren Tagen. Infusorien waren selbst in einer 1%igen Tartratlösung nach 30 Stunden noch in lebhafter Bewegung.

---

<sup>1)</sup> Die Lösungen wurden bei Zimmertemperatur angewendet, da aber diese zwischen 12 und 22° wechselte und der Grad der Giftwirkung von der Temperatur beeinflußt wird, so wurde mehrmals die Temperatur angegeben. Zu allen diesen Versuchen wurde aus Glas destilliertes Wasser verwendet. Das Dikaliumoxalat war als chemisch rein bezogen und dann nochmals umkrystallisiert worden. Wurde die schwach alkalische Reaktion durch etwas Oxalsäure neutralisiert, so war die Wirkung wesentlich die gleiche.

<sup>2)</sup> Es ist bei diesen Versuchen mit Diatomeenschlamm wohl zu beachten, daß oft etwas kohlensaurer Kalk darin vorhanden ist, der durch Umsetzung mit löslichen Oxalaten den Oxalsäuregehalt der Lösung schwächen kann. Es ist deshalb nur sehr wenig Schlamm auf etwa 50 ccm Lösung zu verwenden. Besonders reich an verschiedenen Wassertieren ist Schlamm aus Bassins von Warmhäusern.

### Versuche mit Samen und Keimlingen.

Samen von Rettich, Klee und Gerste, die 2 Tage bei 12 bis 14° in einer 1%igen Lösung von Dikaliumoxalat verweilt hatten, hatten ihre Keimfähigkeit noch nicht eingebüßt. Wahrscheinlich wurde hier das in die Zellen eindringende Salz durch die gespeicherten Kalksalze unschädlich gemacht. Nun wurden Keimlinge von 1 bis 3 cm Wurzellänge aus jenen Samen gezogen und in 0,5%iger Lösung von Dikaliumoxalat eingelegt, so daß sie ganz unter der Oberfläche waren. Als nach 24 Stunden Verweilen bei 12 bis 15° die Lösung abgossen wurde, ergab sich, daß die Wurzeln an ihrem Turgor eingebüßt hatten und nach 2 Tagen stinkende Fäulnis eintrat. In der äquimolekularen Lösung von Dikaliumtartrat (0,75%) waren die Keimlinge vollständig unverändert geblieben und entwickelten sich nachher in Kontakt mit Luft wieder normal weiter. Ein ebenso langes Verweilen in 0,5%iger Lösung von Natriumnitrat schadete ebenfalls den Keimlingen nicht im geringsten.

Junge Keimlinge von Gerste, die eine Sproßhöhe von 4 bis 5 cm erreicht hatten, wurden nun in 1%ige Lösungen von Oxalat und Tartrat eingesetzt. Nach 3 Tagen ergab sich ein beträchtlicher Unterschied. Die Oxalatkeimlinge waren vollständig stationär geblieben, während die Tartratkeimlinge um fast 4 cm gewachsen waren. Nach weiteren 4 Tagen waren diese noch vollständig gesund, während bei den Oxalatkeimlingen die Blätter gelb wurden und abstarben.

In den 0,1%igen Lösungen von Oxalat und Tartrat zeigte sich nach 6 Tagen kein Unterschied in der Sproßhöhe, die 14 cm erreichte, wohl aber zeigten die Wurzeln erhebliche Unterschiede. Die längste Hauptwurzel maß beim Tartrat 11,3 cm und die Seitenwurzeln 1 bis 2,5 cm, während die längste Wurzel in Oxalat nur 8,2 cm maß und die Seitenwurzeln nur 0,2 bis 0,5 cm.

Blätter von Wasserpflanzen, Elodea und Valisneria, erwiesen sich nach 36 Stunden in einer 1%igen Oxalatlösung unter Turgorverlust abgestorben, während sie in den äquimolekularen Lösungen von Kaliumtartrat und Kaliumsulfat noch vollständig unversehrt waren. Als Blätter von Chelidonium in eine 0,5%ige Lösung von Oxalat gestellt wurden, waren nach 4 Tagen die unteren Teile des Blattes und die Stiele erweicht und geschwärzt, während in der äquimolekularen Tartratlösung noch gar keine Schädigung eingetreten war.

Aso<sup>1)</sup> beobachtete, daß Erbsenkeimlinge in 0,5%iger Lösung von Natriumoxalat nach 2 Tagen abgestorben waren, während sie in ebenso starken Lösungen von Natriumacetat und -formiat noch gesund waren und erst später langsam verwelkten. Junge Zweige von *Quercus acuta* zeigten in einer 0,5%igen Lösung von Natriumoxalat schon nach 2 Tagen braune Färbung der Blattnerve in einigen Blättern und nach 5 Tagen waren sämtliche Blattnerve gebräunt, worauf rapide Verwelkung einsetzte. Im Acetat und Formiat aber waren die Blätter nach 2 Tagen

<sup>1)</sup> Bulletin College of Agriculture, Tokyo, 7, 23.

noch völlig normal, und erst nach 5 Tagen zeigte sich partielle Bräunung. Es ist daher das Oxalat weit schädlicher als Acetat und Formiat. Diese beiden letzteren Salze erwiesen sich bei jenen Verdünnungen harmlos für Algen, jedoch auf Phanerogamen sind sie nicht ganz so harmlos wie Nitrat oder Sulfat von Kalium und Natrium.

### Versuche mit Algen.

In einer 0,1%igen Lösung von Oxalat wurden Fadenalgen und Diatomeen in 24 Stunden nicht oder kaum merklich beschädigt gefunden. Kleinere Spirogyraarten starben darin erst nach 3 bis 5 Tagen, größere in 8 bis 10 Tagen. Oscillarien lassen darin 3 Tage lang Bewegung erkennen. Dagegen wirkte 0,2%ige Lösung schon weit schädlicher, indem Fäden von Spirogyra, Ödogonium und Cladophora schon in 21 Stunden abstarben; eine Anzahl von Spirogyrazellen kann bei bereits beschädigtem Zellkern noch vollen Turgor zeigen, während eine kleine Zahl von Zellen dann noch ganz normal erscheinen kann. Diatomeen bleiben nach dieser Zeit ohne Bewegung und zeigen kontrahierten Inhalt. In 50 Stunden waren sämtliche Organismen tot, während sie in der Kontrollösung mit 0,3%igem Tartrat sämtlich unbeschädigt waren und bei den Diatomeen rege Bewegung stattfand.

In 0,5%iger Lösung wurden Fadenalgen wie Spirogyra, Zygnema, Mougeotia, Vaucheria, Sphaeroplea, Cladophora, Ödogonium nach 20 bis 24 Stunden unter Turgorverlust und Verquellung der Protoplasten abgestorben gefunden, während sie in der äquimolekularen Lösung von Tartrat völlig unbeschädigt geblieben waren, ja selbst in der 1%igen Tartratlösung waren bei 12 bis 14° Diatomeen nach 30 Stunden noch in Bewegung.

Da bei höheren Konzentrationen als 1% selbst manche sonst gänzlich ungiftige Salze durch osmotische Störung Plasmolyse erzeugen und nach 2 bis 3 Tagen Schaden bringen können<sup>1)</sup>, so dürfen solche

---

<sup>1)</sup> Siehe hierüber O. L. u. K. Aso im Bulletin College of Agriculture, Tokyo, Japan 7, 403 und Takeuchi, ibid. 635. Während man mehrfach behauptet, daß jedes einzelne Salz für sich schädlich auf die Zellen wirke und erst durch ein zweites Salz diese schädliche Wirkung aufgehoben würde, und ferner, daß auch Chlorcalcium in Abwesenheit anderer Nährsalze schwach toxisch wirken könne, hat sich aus unseren Untersuchungen ergeben, daß sogar eine 1%ige Chlorcalciumlösung bei Ausschluß jedes anderen Salzes 4 Monate lang von Spirogyren ertragen wird und eine 0,3%ige Lösung selbst nach 8 Monaten die Spirogyrenzellen nicht abgetötet hat, wenn diese auch allmählich an Hungererscheinungen litten. Es scheint wirklich kein besseres Mittel zu geben, um jene Algen bei Ausschluß jedes Wachstums lange lebend und fast frei von Parasiten zu erhalten, als Chlorcalcium. Von einer auch nur „schwach toxischen“ Wirkung auf Algen kann bei Chlorcalcium gar keine Rede sein. Wenn Pflanzen in voller Nährlösung durch größeren Kalküberschuß im

Lösungen von Oxalat und Tartrat nur während kurzer Zeit verglichen werden; indessen zeigt sich, daß Dikaliumtartrat ganz auffallend unschädlich ist gegenüber dem Dikaliumoxalat, Spirogyra schien selbst nach 3 Tagen in einer 1%igen Lösung von Tartrat gänzlich unbeschädigt, aber Infusorien und Diatomeen, die wohl nach 30 Stunden noch lebend waren, starben doch im Verlauf von 2 weiteren Tagen in dieser Lösung ab. In 1%iger Lösung von Dikaliumtartrat war die Alge Closterium nach 22 Stunden noch unbeschädigt, in der 2%igen Lösung aber schon nach 1 Stunde mehr oder weniger plasmolysiert.

Sowohl bei niederen Tieren wie bei den Algen bemerken wir verschiedene Grade der Empfindlichkeit gegen die Giftwirkung von Oxalat, einerseits individuelle Unterschiede bei derselben Art, andererseits Unterschiede bei Verschiedenheit der Art. Erstere Unterschiede werden vielleicht darauf beruhen, daß eine geringe Menge Kalksalze in manchen Zellen gelöst vorhanden ist, welche die anfänglich eindringenden Oxalaten durch Ausfällung als Calciumoxalat unschädlich machen, letztere Unterschiede aber werden wohl damit zusammenhängen, daß das Zellinnere nicht bei allen Arten von Organismen gleich rasch vom Oxalat erreicht werden kann, daß also gewisse Schutzvorrichtungen oder Hindernisse irgendwelcher Art dem Eindringen des Oxalats gegenüberstehen. Einen ziemlich markanten Unterschied kann man z. B. zwischen den Algen Spirogyra und Closterium beobachten. Spirogyra wird von einer 1%igen Lösung von Oxalat in wenigen Minuten angegriffen, so daß sie, selbst wenn der Turgor noch vollständig vorhanden ist, nach Überführung in Quellwasser sich nicht mehr erholen kann; Closterium aber, wie auch Diatomeen, werden bei 12 bis 14° von dieser Lösung erst nach einigen Stunden angegriffen.

Bei Spirogyra handelt es sich um ein fast blitzartiges Vordringen des Oxalats in das Innere, was offenbar durch die vielen Plasmastränge, die vom Cytoplasma und dem darin liegenden Chloroplasten zum Zellkern führen, ermöglicht wird.

---

Wachstum gehemmt werden, so kommt eine wesentlich andere Frage in Betracht; um eine „toxische“ Wirkung handelt es sich auch hier nicht. Chlorkalium oder Chlornatrium werden in 1%iger Lösung von den gleichen Algenfäden keine 3 Tage ohne Plasmolyse ertragen. Siehe auch Flora 1911, 104. Es ist auch die Anwesenheit von Chlorcalcium im Blute behauptet worden. Das wäre aber nur möglich unter Vernichtung der normalen Alkalinität des Blutes. Der Körper würde übrigens mit Chlorcalcium bald unter Bildung von doppeltkohlensaurem Kalk aufräumen.



Da nun bei dieser Alge der Chloroplast ein schraubenförmig gewundenes Band darstellt, das bei manchen Arten so gestreckt ist, daß der Zellkern mit seinen Plasmasträngen und Tasche sehr deutlich hervortritt, da ferner der bandförmige Chloroplast am Rande gelappt ist und diese rundlichen Lappen den geringsten schädlichen Eingriff durch ihre Contraction zu erkennen geben, so bot diese Alge für das nähere Studium der Giftwirkung von Oxalaten ein sehr geeignetes Objekt dar.

Legt man nun geeignete Fäden von *Spirogyra communis*, *Sp. majuscula* oder *Sp. crassa* in etwa 10ccm einer 1%igen Oxalatlösung und nimmt alle 2 Minuten einen Faden zur mikroskopischen Besichtigung heraus, so findet man bei 5- bis 600facher Vergrößerung bei den kleineren Arten in 9 bis 10 Minuten, bei den größeren in 15 bis 16 Minuten den Kern samt seiner Tasche zu einem dünnen Gebilde kontrahiert<sup>1)</sup>; der mit der Tasche ein linsenförmiges Gebilde darstellende Kern, der unter dem Mikroskop sich als Spindel darstellt, erscheint nun wie ein dünner unregelmäßiger Faden (in Wirklichkeit Platte). Die rasche Veränderung ist um so interessanter und merkwürdiger, als bei manchen anderen Tötungsarten, wie z. B. durch Äther, verdünnten Alkohol oder Kochen, die Plasmastränge abreißen und der Zellkern als unregelmäßige rundliche Masse auf die Wand der Zelle fällt, statt in der Mitte aufgehängt zu bleiben, wie nach Behandlung mit Oxalat oder bei „Fixierung“ mit Übersmiumsäure<sup>2)</sup>.

Etwa 6 Minuten nach der Tötung des Zellkerns<sup>3)</sup> sieht man die rundlichen Lappen des Chloroplastenbandes sich zuspitzen, hierauf werden sie kleiner und verschwinden zum Teil im Bande; dann kontrahiert sich das Band selbst, bringt Unordnung in das Cytoplasma, und dieses stirbt schließlich in 1 bis 2 Stunden ebenfalls ab. Aus dieser überraschenden

<sup>1)</sup> Bei direkter Operation unter dem Mikroskop kann die Lösung nicht von allen Seiten her in die Zellen dringen und verläuft deshalb der Vorgang etwas langsamer; man nehme hier eine 2%ige Lösung.

<sup>2)</sup> Bei dieser „Fixierung“ schrumpft aber der Kern überhaupt nicht, auch nicht seitlich wie beim Oxalat. Die seitliche Schrumpfung in letzterem Falle dürfte hauptsächlich dadurch bedingt sein, daß die Plasmastränge bei ihrem Absterben in situ erhalten bleiben und nicht abreißen wie bei manchen anderen Tötungsarten, und deshalb die Contraction nur von den Seiten her stattfinden kann. Ebenso ist es bei Tötung mit Kupfersulfat und Queckkälberchlorür.

<sup>3)</sup> Auch bei dem Zellkern der Zwiebel beobachtete ich rasche Contraction — um  $\frac{1}{5}$  seines Durchmessers — unter dem Einflusse einer 2%igen Oxalatlösung, — Die rasche Abnahme der Giftwirkung, wenn die Oxalatlösung von 0,5 auf 0,1 % verdünnt wird, deutet auf eine ziemlich feste Bindung des Calciums.

Reaktion habe ich seinerzeit geschlossen, daß Calcium eine wichtige Rolle im Zellkern spiele und daß Kaliumoxalat mit solchen Calcium enthaltenden Bestandteilen (Nucleoproteiden, Chromatin, Plastin) des Zellkerns und das Chloroplasten in der Weise reagiert, daß das Calcium als Oxalat aus seiner Bindung losgelöst und durch das Kalium des Kaliumoxalats ersetzt wird. Die entstehende Kaliumverbindung wird ein anderes Imbibitionsvermögen als die Calciumverbindung haben, weshalb unter Wasserauscheidung aus den anatomischen Elementen jetzt Contraction erfolgt, welche eine mechanische Störung herbeiführt und infolge nun auch die Labilität des Protoplasmas eingebüßt wird. Der Chloroplast wird dann in gleicher Weise angegriffen. Der Tod des Cytoplasmas, der durch Ablösung von der Zellwand und den Turgorverlust der Zelle erkennbar wird, erfolgt zuletzt, trotzdem das Oxalat zuerst in dasselbe eindringt, woraus ich schloß, daß das Cytoplasma entweder keine calciumhaltigen morphologischen Elemente besitzt, oder solche von untergeordneter Bedeutung.

Der Umstand, daß weder im Kern noch im Chloroplast nach der Tötung durch Kaliumoxalat Krystalle von Calciumoxalat sichtbar werden, ist wohl darauf zurückzuführen, daß das Atomgewicht des Calciums gegenüber dem mindestens 100fachen Molekulargewicht von Nucleoproteiden zu gering ist, um in der ohnehin ziemlich festen Masse des Kernes deutlich Krystalle entstehen lassen zu können.

Die Beobachtung Schimpers, daß der wässrige Extrakt von Blättern wohl oft Reaktionen auf Kali und Magnesia gibt, nicht aber auf Kalk, trotzdem in der Asche der Blätter der Kalk einen sehr bedeutenden Prozentsatz ausmacht, ist durch das Verborgensein des Calciumgehalts im Kern und Chloroplasten leicht erklärlich. Schimper suchte mikrochemisch Kalk in den Blättern auf folgende Art nachzuweisen: „Schnitte wurden mit Kaliumoxalat und Eau de Javelle behandelt, ausgewaschen mit Wasser und Alkohol, dann in Origanumöl untersucht.“ Da er auf diese Weise keine Krystalle von Calciumoxalat sehen konnte, schließt er auf häufige Abwesenheit von Kalk in den Blättern und die Möglichkeit der Existenz kalkfreier Blätter. Aus seinem Befunde hätte er jedoch nur schließen können, daß keine löslichen Kalksalze in seinen Blättern enthalten waren; aber nicht, daß Kalk ganz abwesend war; denn gerade die Blätter sind ja bekanntlich stets als die kalkreichsten Organe der ganzen Pflanze erwiesen worden und zwar auch dann, wenn wie bei den meisten Gramineen Calciumoxalat in den Blatzellen gar nicht vorhanden ist. Der relative Kalkreichtum der Blätter erklärt sich sehr einfach nach unseren

Befunden, wenn man bedenkt, daß hier außer dem calciumhaltigen Zellkernen zugleich zahlreiche calciumhaltige Chloroplasten<sup>1)</sup> im Assimilationsgewebe vorhanden sind. Schimper meint, die Funktion des Kalks bestehe darin, daß er die schädliche Oxalsäure, die im Stoffwechsel entstehe, ausfalle, aber es gibt viele Gewächse, die niemals Oxalsäure im Stoffwechsel erzeugen, ebensowenig als Weinsäure oder Citronensäure, und doch Calcium ebenso nötig haben wie die anderen.

Auch in den Meristemen konnte Schimper mit seiner Methode keinen Kalk mikroskopisch nachweisen und meint deshalb mit demselben Unrecht wie oben, daß Kalk unwesentlich für die Meristeme sei. Wie ungerechtfertigt dieser Schluß ist, ergibt unter anderem die Beobachtung von Warthiadi<sup>2)</sup>, daß bei Kalkmangel die Meristeme zuerst von allen Teilen eines Zweiges absterben, bei Magnesiummangel aber zuletzt. Ja Schimper selbst erwähnt (l. c.), „daß bei Kalkmangel die Knospen der Tradescantiazweige bald zugrunde gehen“.

Wie einschneidend ein zeitweiliges Verweilen in Lösungen ohne Calcium auf junge Pflanzen wirken kann, ergibt sich auch aus einigen Versuchen Montemartini<sup>3)</sup>. Er ließ z. B. ganz junge („appena nata“) Keimpflanzen von *Torenia* einerseits 8 Tage in 0,2%igen Lösungen von Kaliumnitrat, andererseits 14 Tage in 0,2%igen Lösungen von Calciumnitrat, dann kamen die Pflänzchen wieder in volle Nährlösung. Jene Pflanzen blieben kümmerlich und bildeten keine Blüten, diese aber erreichten eine volle normale Entwicklung und bildeten Blütenknospen oberhalb des 4. Knotens. Es wurden ferner Keimlinge zuerst 10 Tage in Lösung von 0,2%igem Monocalciumphosphat gesetzt, dann eine Woche lang in Nährlösung ohne Calcium und hierauf in volle Nährlösung. Das Wachstum dieser Pflänzchen war kümmerlich und die Blütenbildung blieb aus.

Stohmann<sup>4)</sup> kultivierte Maiskeimlinge 5 Wochen lang in calciumfreier Nährlösung, wobei die Vegetation bald zu einem Stillstand kam.

<sup>1)</sup> Es mag hier angeführt werden, daß der Chlorophyllfarbstoff im Gegensatz zu der plasmatischen Grundsubstanz des Chlorophyllkornes keinen Kalk, sondern organisch festgebundene Magnesia enthält (Willstätter).

<sup>2)</sup> Veränderung der Pflanze unter dem Einfluß von Kalk und Magnesia. Verlag von Fr. Gais, München. S. 112.

<sup>3)</sup> Atti del Istituto Bot. di Pavia 14, 117.

<sup>4)</sup> Ann. chem. Pharm. 121.

Als er nun einen Zusatz von Calciumnitrat gab, drangen schon nach 5 Stunden aus den welk gewordenen Spitzen frische grüne Triebe hervor, die sich rasch weiter entwickelten.

Heiden<sup>1)</sup> fand, daß bei Ausschluß von Calcium aus einer Nährlösung Mais und Erbsenpflanzen viel früher abstarben, als bei Ausschluß irgend eines anderen Nährstoffes.

Wenn man die Wirkung der freien Oxalsäure an Zellen verfolgen will, so ist hier auf eine doppelte Art der Giftwirkung Rücksicht zu nehmen: Erstens auf die Acidität an sich, weil jede saure Substanz koagulierend und umlagernd auf die labilen Proteinstoffe der lebenden Substanz wirkt, und zweitens auf die kalkentziehende Wirkung, die allerdings die verschiedensten Säuren in freiem Zustande äußern können, indessen doch bei der Oxalsäure in höherem Grade hervortreten wird als bei anderen organischen Säuren. Es zeigt sich nun, wenn man Lösungen von 0,5% iger Oxalsäure mit der äquimolekularen Lösung (1%) von Citronensäure vergleicht, daß bei Algen der Tod etwa gleich schnell in beiden Fällen eintritt. In zwei Minuten hat der Zellkern unter Trübung eine Quellung erlitten und in weniger als 10 Minuten ist der Turgor der Zellen verloren und der Chloroplast wird gelb. Vergleicht man aber in höheren Verdünnungen, so ist die Wirkung der Oxalsäure eine weit raschere als die der Citronensäure, obgleich letztere wegen ihrer dreibasischen Natur einen höheren Aciditätsgrad im Molekül hat als erstere. Wenn man eine mäßige Anzahl Spirogyrafäden in ca. 500 ccm einer 0,005% igen Oxalsäurelösung einlegt, so gewahrt man bei mikroskopischer Besichtigung nach 2 Stunden, daß schon die Hälfte der vorhandenen Zellen abgestorben ist, der Kern ist kontrahiert und hat oft eine Art Blase<sup>2)</sup> um sich, Chloroplast und Cytoplasma sind ebenfalls kontrahiert. In der äquimolekularen Lösung (0,01%) von Citronensäure aber ist selbst nach 5 Stunden noch keine Zelle beschädigt. In 0,005% iger

<sup>1)</sup> Centralbl. f. Agrikulturchem. 17, 622.

<sup>2)</sup> Migula, der schon früher (Über den Einfluß stark verdünnter Säuren auf Algenzellen, Breslau 1888) solche Beobachtungen bei freier Oxalsäure machte, erklärte jene Blase für eine Schwellung des Kernes, was ja auch richtig sein wird, aber der ganze Kern schwillt nicht auf, es bleibt ein Teil im Zentrum der Schwellung als trübe Masse zurück. Migula erklärte die Oxalsäure als die giftigste der von ihm geprüften Säuren.

Oxalsäurelösung sind nach 3 Stunden Oscillarien und Diatomeen noch in Bewegung, aber die meisten Infusorien tot. Nach 16 Stunden wurden noch einige Vorticellen und einige Diatomeen und grüne Flagellaten in Bewegung gesehen; bald darauf starben auch diese Organismen ab<sup>1)</sup>.

Läßt man eine Oxalsäurelösung von 0,0001% auf Spirogyrafäden wirken, so bemerkt man nach 5 Tagen in den meisten Zellen Schrumpfung des häufig von seinen Plasmasträngen losgerissenen Kernes und Verquellung des Randes der Chloroplastenbänder, während das Cytoplasma noch lebt und den Zellen noch Turgor verleiht. Weinsäure läßt bei gleicher Verdünnung in derselben Zeit die Zellen unbeschädigt und erst nach 9 Tagen fangen einige Zellen an zu kränkeln. Selbst in 0,001%iger Weinsäure sind nach 5 Tagen die Zellen noch so gut wie unbeschädigt<sup>2)</sup>.

Bestünde die Funktion der Calciumsalze lediglich in der Teilnahme an der Membranbildung oder in der Beihilfe zum Transport der Kohlenhydrate (was nur bei höher differenzierten Pflanzen, aber nicht bei Fadenalgen in Betracht käme), oder darin, die schädliche Oxalsäure in den Zellen zu fällen, so wären die oben geschilderten Giftwirkungen der Oxalsäure und ihrer Salze ganz unbegreiflich. Benecke<sup>3)</sup> wies darauf hin, daß auch die Hypothese Grooms, die Funktion von Kalk bestehe in der Förderung der Mobilisierung der Stärke, nicht richtig sein könne, da die Alge *Vaucheria* gar keine Stärke führe, sondern statt ihrer Fett, und trotzdem calciumbedürftig sei. Porthelm<sup>4)</sup> zeigte, daß bei den an Kalkmangel zugrunde gegangenen Pflanzen keine Säurezunahme beobachtet werden könne, was gegen Schimpers Auffassung spricht. Es soll indessen hier nicht bestritten werden, daß Calciumsalze noch wertvoll in anderer Hinsicht sein können.

Von wesentlichem Interesse ist ferner in diesem Zusammenhang, daß schwefelsaure Magnesia und andere lösliche Magne-

<sup>1)</sup> Spirogyra ist daher auch hier am empfindlichsten, wie gegen Oxalat.

<sup>2)</sup> Heymann verglich die Wirkung der freien Oxalsäure mit derjenigen ihrer letzten Homologen auf Frösche und fand, daß 0,01 g freie Oxalsäure für einen Frosch letal ist, bei Malonsäure ist die letale Dosis doppelt so hoch, bei Bernsteinsäure aber 4 bis 5 mal so hoch; ähnliche Unterschiede ergaben sich für die Natriumsalze dieser Säuren.

<sup>3)</sup> Bot. Ztg. 1908, 87.

<sup>4)</sup> Wien. Akad. Ber. 110, 155.

siumsalze eine Giftwirkung auf Pflanzen ausüben, die nur durch Calciumsalze vollständig paralytisiert, durch Kaliumsalze aber nur verzögert werden kann, so daß also die physiologischen Funktionen der Magnesiumsalze überhaupt nur bei Gegenwart von Calciumsalzen ausgeführt werden können. Man ist somit gezwungen, zwischen dieser Giftwirkung und der von Oxalat eine Analogie anzunehmen, denn beide Giftwirkungen werden durch Calciumsalze unmöglich gemacht, Man muß somit schließen, daß bei der Giftwirkung von Magnesiumsalzen es sich ebenfalls um eine Entfernung des Calciums aus wichtigen morphologischen Elementen handelt, wobei die Stelle des Calciums durch Magnesium eingenommen wird, was zu einer tödlichen Strukturstörung durch Veränderung der Imbibitionskapazität führt.

Schwefelsaure Magnesia wirkt aber weit langsamer schädigend auf die Zellen von Spirogyra und anderer Algen ein als Kaliumoxalat. In einer 1%igen Lösung (wasserfreies Salz) in reinstem destilliertem Wasser sind erst nach 12 bis 20 Stunden bei 16 bis 18° die meisten Zellen der eingelegten Spirogyrafäden tot; ebenso bei Cladophora, Closterium usw.; alle zeigen kontrahierten Inhalt und Turgorverlust. Nur sehr wenige der vorhandenen Diatomeen sind noch in Bewegung, die meisten Infusorien sind kontrahiert. Nach Ersatz der Lösung durch Quellwasser wurde nur hier und da ein Infusor wieder in Bewegung gesehen. Wurde Quellwasser mit 0,011% Kalk statt destilliertem Wasser zur Lösung jenes Salzes verwendet, so waren alle Absterbeerscheinungen verlangsamt, und wenn nach 20 bis 24 Stunden die Lösung nun durch reines Quellwasser wieder ersetzt wurde, waren nach 3 Stunden viele Diatomeen, Infusorien und Ostracoden wieder in lebhafter Bewegung. Eine Lösung von 0,5% (wasserfrei) jenes Salzes in kalkhaltigem Quellwasser übte innerhalb 24 Stunden bei 12 bis 15° überhaupt noch keine Giftwirkung aus.

In einer 1%igen Lösung von Magnesiumnitrat in destilliertem Wasser starben Spirogyren nach 6 bis 12 Stunden, in einer 0,1%igen nach 4 bis 5 Tagen und in einer 0,02%igen Lösung nach 10 bis 11 Tagen. Meist kann man dabei beobachten, daß zuerst der Zellkern angegriffen wird.

Schon relativ wenig Calciumsalz reicht hin, die letale Giftwirkung von Magnesiumsalzen zu verhindern, wahrscheinlich weil hier vor Eintritt ernstlicher Störungen ein reversibler Vor-

gang stattfinden kann; aber eine Verlangsamung des Wachstums von Phanerogamen ist doch immer zu bemerken, solange die Menge des resorbierten Calciums nicht ungefähr gleich ist derjenigen des Magnesiums. Steigt aber dann die dargebotene Kalkmenge beträchtlich höher an, so treten wieder Hemmungserscheinungen auf. Der Schluß, daß für die meisten unserer Kulturpflanzen die Optimalentwicklung nur erreicht wird, wenn ein günstiges Kalk-Magnesiumverhältnis dargeboten wird, liegt sehr nahe, wenn man erkannt hat, daß einerseits Magnesium als sekundäres Phosphat die Phosphorsäureassimilation in den Zellen vermittelt<sup>1)</sup> und andererseits Calcium mit den Nucleoproteiden des Zellkerns in Verbindung tritt; daß ferner Magnesiumüberschuß über Calcium diese Calciumassimilation erschwert, andererseits ein Überschuß von Calcium über Magnesium die Phosphorsäureassimilation in den Zellen lähmt, indem sich vorwiegend Calciumphosphat statt Magnesiumphosphat bildet. Zahlreiche Versuche, nicht nur von mir und meinen Kollegen und Schülern, sondern auch von Bernardini und seinen Mitarbeitern, von Portheim, Hansteen, Völcker und von Warthiadi haben gezeigt, daß das beste Kalkmagnesiumverhältnis für viele unserer Kulturpflanzen sich zwischen 1:1 und 3:1 bewegt. Einige Widersprüche beruhen auf unrichtig angestellten Topfversuchen mit viel zu viel Pflanzen im Topf, wodurch die Pflanzen ihre normale Entwicklung gar nicht erreichen konnten, weil die an der Topfwand hinlaufenden Wurzeln in ihrer Resorptionsfunktion beeinträchtigt wurden. Es wurde auch entgegnet, daß unsere Resultate nur beweisen, daß von Calcium und Magnesium ganz bestimmte Minima nötig seien zur Optimalentwicklung von Pflanzen. Indessen unsere Ver-

---

<sup>1)</sup> Schimper schreibt diese Funktion dem Calciumphosphat zu, ohne hierfür jedoch eine Stütze beibringen zu können. Von allen Phosphaten, die im Pflanzenkörper vorkommen können, ist nur das sekundäre Magnesiumphosphat leicht hydrolytisch dissoziierbar und kann deshalb nur dieses leicht genug Phosphorsäure abgeben zur Bildung von Nucleoproteiden. Zudem ist es weit leichter löslich als das sekundäre Calciumphosphat. Magnesia wird immer in größeren Mengen angetroffen, wo rege Phosphorsäureassimilation stattfindet, wie bei der Keimung von Samen und Entwicklung von Knospen. Siehe weiteres hierüber O. L. in Flora 1892, 380.

suche zeigen, daß jene besten Verhältnisse auch bei stärkeren Düngungen mit Calcium- und Magnesiumsalzen Gültigkeit haben.

Ein Antagonismus zwischen den Funktionen des Kalks und der Magnesia ist auch für das Tier durch die höchst merkwürdigen Versuche von Meltzer und Auer<sup>1)</sup> erwiesen worden. Diese Autoren schließen, daß „Calcium der wirksamste Antagonist des Magnesiums ist und daß die verschiedenen Hemmungsvergänge, die von Magnesium hervorgerufen werden, von Calcium in der kürzesten und nachdrücklichsten Weise beseitigt werden können“.

Es ist wohl ausgeschlossen, daß Oxalate auch in anderer Weise giftig wirken könnten, als durch Calciumentziehung; denn es sind keine anderen spezifischen Wirkungen der Oxalsäure bekannt, die hier zur Erklärung ebenfalls herangezogen werden könnten. Man hat wohl früher einmal versucht, die Abspaltung von Kohlenoxyd aus Oxalsäure zur Erklärung der Giftwirkung auf Vertebraten zu verwenden; allein hier stößt man denn doch auf verschiedene Schwierigkeiten, da die Vergiftungssymptome bei Oxalsäure und Kohlenoxyd sehr verschieden sind. Zudem sind Oxalate auch für niedere Tiere und Pflanzen giftig, für welche Kohlenoxyd in mäßigen Mengen ganz unschädlich ist<sup>2)</sup>. Auch widerlegten Kobert und Küssner jene Kohlenoxydhypothese. Mit jener Ansicht über Calciumentziehung stimmen aber bis jetzt sämtliche bekannte Tatsachen, unter anderem auch die analoge Wirkung von Fluornatrium, das außer einer spezifischen Wirkung auch kalkentziehende Wirkung ausübt. Eine 1%ige Lösung von Fluornatrium ruft bei *Spirogyra* in wenigen Minuten dieselbe charakteristische Contraction von Zellkern und Chloroplast hervor, wie oxalsaures Kali bei gleicher Konzentration.

Beide Salze haben aber außer Calciumfällung keine besondere Eigenschaften miteinander gemein.

<sup>1)</sup> Centralbl. f. Physiol. 21, 788. Wenn einem Kaninchen subcutan 1,7 g Magnesiumsulfat pro Kilogramm Tier injiziert wird und dann, sobald Narkose und Lähmung eingetreten ist, durch die Ohrvene 8 com einer 3%igen Chlorcalciumlösung, so bemerkt man schon nach wenigen Sekunden Beschleunigung der Atmung, und das Tier setzt sich auf.

<sup>2)</sup> Es wurde z. B. berichtet, daß *Blatta orientalis* unempfindlich gegen Kohlenoxyd sei, und bei Keimlingen beobachtete Linossier (Compt. rend. 108), daß ihre Entwicklung nicht verhindert wird in einer Luft, der 79% CO beigemischt sind. Bakterienentwicklung wird durch CO zwar verlangsamt, aber nicht verhindert (Frankland).



Daß der Calciumgehalt bei tierischen Zellen ebenfalls an den Zellkern gebunden ist, dürfte wohl einerseits daraus hervorgehen, daß der Calciumgehalt wächst mit der relativen Masse der Zellkerne in den Organen, denn die Muskeln der Säugetiere sind kalkärmer als die Drüsen, und die weiße Hirnsubstanz kalkärmer als die graue, andererseits daraus, daß die roten Blutkörperchen der Säugetiere und Vögel kein Calcium enthalten, aber auch keinen Kern besitzen<sup>1)</sup>. Es wäre ferner auch kaum anzunehmen, daß bei den Pflanzenzellen das Calcium im Zellkern, bei den Tierzellen aber nicht im Zellkern, sondern im Cytoplasma gebunden wäre. Da die oxalsauren Salze bei Tiervergiftung vor allem das Zentralnervensystem angreifen, so dürfte wohl auch klar sein, daß Calcium auch in den Ganglienzellen eine sehr wichtige Rolle spielt und nicht etwa eine nebensächliche Stoffwechselfunktion ausübt<sup>2)</sup>. Da die Ganglienzellen sensibler gegenüber Reizen, also auch weit labiler und reagierfähiger sind als die anderen Zellen des Tierkörpers, so reagieren sie noch auf Verdünnungen der Oxalate, bei denen die anderen Zellgewebe nur wenig affiziert werden.

Mit der Erkenntnis, daß Calciumverbindungen eine überaus wichtige Rolle in dem pflanzlichen und tierischen Zellen spielen, steht es nun in ganz auffallendem Kontrast, daß für die niedersten pflanzlichen Organismen Oxalate gar kein Gift

---

<sup>1)</sup> Abderhalden fand kein Calcium, Aloy nur Spuren in den roten Blutkörperchen. Die Muskeln der Säugetiere enthalten im Durchschnitt 0,095 Teile Ca in 1000 Teilen frischer Substanz (Katz), die Drüsen aber 0,296 (Aloy, Toyonaga u. a.). Die graue Hirnsubstanz beim Pferde zeigt nach Toyonaga 0,777 Ca pro Mille, gegenüber 0,037 bei der weißen Substanz oder, auf Fett und Cholesterin freie Substanz berechnet: 1,026 versus 0,092.

<sup>2)</sup> Wie wichtig eine normale Kalkversorgung für die verschiedenen Körpergewebe ist, geht auch daraus hervor, daß im Tierorganismus im Bedarfsfalle auf das Kalkreservoir im Knochen zurückgegriffen wird wie bei Hungerperioden; auch der öfters beobachtete mürbe gewordene „senile Schädel“ bildet ein schönes Beispiel hierfür. Es sei ferner hier noch auf die Arbeit von Kochmann und Petzsch über den Kalkstoffwechsel hingewiesen, diese Zeitschr. 31 u. 32, Kochmann, *ibid.* S. 361, meint: Es ist vielleicht nicht mehr verwegen, den Gedanken auszusprechen, daß ohne Calcium eine normale Funktion der Zellen nicht möglich ist.

sind<sup>1)</sup>. Ebenso wenig wirken größere Dosen von Magnesiumsalzen bei Abwesenheit von Calciumsalzen schädlich auf diese Organismen, und Fluornatrium ist für sie ein weit schwächeres Gift als für die höheren calciumbedürftigen Formen<sup>2)</sup>. Jene niederen Organismen können sich in Nährlösungen ohne eine Spur von Calciumsalzen üppig entwickeln<sup>3)</sup>. Sie bedürfen also Calciumsalze weder zur Bildung calciumhaltiger Plasmateile noch zu wichtigen Zwecken im Stoffwechsel, wenn auch in gewissen Fällen Calcium nützlich sein mag. Es bleibt hier wohl kaum eine andere Folgerung übrig, als daß da, wo überhaupt noch Zellkerne vorhanden sind, die einfachere Bauart dieser Zellkerne noch kein Calcium benötigt und daß weiter die calciumhaltigen Zellkerne der Zellen höherstehender Pflanzen Funktionen ermöglichen, die bei jenen niedersten Formen noch nicht notwendig sind<sup>4)</sup>. Die Funktionen der Zellkerne können chemische oder anatomische sein. Zu den chemischen gehört vor allem die Respiration und die Bereitung von Proteinen und Enzymen, zu den anatomischen die Entwicklung von gleichartigen Zellen durch Teilung, die Bildung von Sexualzellen, die Differenzierung der Zellen bei Entwicklung verschiedener Gewebe; vor allem kommt in Betracht, daß das Prinzip der Vererbung im

---

<sup>1)</sup> Ich habe dieses für Bakterien, Hefe und *Penicillium* nachgewiesen, *Flora* 1892, 374 u. 390, ferner für *Palmella* und *Scenedesmus* (*Bot. C.* 1895. Nr. 52 und *Flora* 1905, 333. Auch die niedersten Flagellaten scheinen hierher zu gehören.

<sup>2)</sup> *Flora* 1905, 330.

<sup>3)</sup> Molisch hat dieses für *Aspergillus*, *Microthamnion*, *Stichococcus*, *Pleurococcus* und für die vegetative Form von *Ulothrix* dargetan. *Wien. Akad. Ber.* 1895. Bei *Ulothrix* ist nach gütiger Privatmitteilung von Herrn Prof. Molisch nicht speziell Aufmerksamkeit darauf verwendet worden, ob bei Abwesenheit von Kalk auch Gametenkopulation möglich ist.

<sup>4)</sup> Wollen wir einen groben Vergleich machen, so könnte man darauf hinweisen, daß man einfache Hütten aus ganz lockerem Baumaterial errichten kann, kompliziertere Bauten aber nur mit Material von bedeutender Festigkeit. Ob die Ca-haltigen Chloroplasten der höheren Algen und Phanerogamen an Energie der Stärkebildung die kalkfreien der niedersten Algenformen übertreffen, bleibt noch zu untersuchen. Es wäre übrigens denkbar, daß der Kern, wenn er calciumhaltige Verbindungen für sich herstellt, solche auch an die Chloroplasten abgibt, auch ohne daß so die Arbeit der Chloroplasten gesteigert würde.

Zellkern festgelegt wird, was aber nur mittelst einer äußerst genau präzisierten offenbar sehr komplizierten Tektonik möglich sein kann, Verhältnisse, welche eines der schwierigsten Probleme der Biologie bilden.

Vergleichen wir nun die chemischen Leistungen niederer und höherer Algen und Pilze, so wird man kaum hierbei auf einen besonderen, nur von der Gegenwart von Calcium abhängigen Chemismus stoßen. Der Stoffwechsel der niedersten Algen wird sich nicht erheblich unterscheiden von dem der höheren, und was die niederen Pilze betrifft, so weisen sie in mancher Hinsicht weit bedeutendere chemische Leistungen auf als die höher stehenden. Ganz staunenswert ist z. B. die Schnelligkeit der Eiweißbildung bei vielen Bakterienarten, selbst wenn so einfache Kohlenstoffquellen wie Natriumacetat oder Tartrat und als Stickstoffquelle nur Ammoniak dargeboten werden. Und was die Bereitung von Enzymen betrifft, so sind auch darin die niederen Pilze Meister.

Es wird sich also weit wahrscheinlicher um die Ermöglichung mancher anatomischer Funktionen durch einen feineren Aufbau der Zellkerne handeln, der mit calciumhaltigen Nucleoproteiden leichter erreicht werden dürfte. Wo Sexualorgane auftreten, wie z. B. bei der Alge *Vaucheria*, oder eine Differenzierung von Zellen für verschiedene Gewebe stattfindet, da finden wir auch das Calciumbedürfnis vor, soweit bis jetzt Untersuchungen vorliegen.

Bei den höheren Pilzen bedarf *Coprinus* mit seiner hohen Differenzierung zu Stiel, Hut und Sporen tragenden Lamellen des Calciums<sup>1)</sup>. Dieser Pilz hat jedoch keine geschlechtliche Fortpflanzung. Ferner gehört zu den calciumbedürftigen Pilzen *Entomophthora*<sup>2)</sup>, ein Pilz aus der Klasse der *Phycomyceten*, die außer geschlechtslos entstehenden Sporangien und Conidien auch kopulierende Gameten und sexuelle Differenzierung besitzt<sup>3)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Weir, Flora 1911, 87.

<sup>2)</sup> Hori, *ibid.* 1910, 477.

<sup>3)</sup> In dieser Beziehung ist eine Beobachtung von Klebs von Interesse, daß nämlich Oxamid ein Gift für *Saprolegnia* ist. Dieses beruht wahrscheinlich darauf, daß das Oxamid in den Zellen durch die in vielen Pilzen ja vorhandene Amidase in oxalsaures Ammoniak umgewandelt

Bei den Pilzen sind jedoch noch weitere Untersuchungen über das Calciumbedürfnis nötig, da es möglich ist, daß in jeder Klasse die niederen Formen Calcium nicht bedürfen, sondern nur die höheren.

So kommen in der Klasse der Ascomyceten sowohl einfache Arten, die Calcium nicht bedürfen, vor, wie *Penicillium*, *Aspergillus*, *Saccharomyces* (Hemiascomyceten), als auch Formen mit hochdifferenzierten Fruchtkörpern wie Morchel und Trüffel, die noch auf Kalkbedürfnis zu prüfen sind. In der Klasse der Basidiomyceten beobachten wir einerseits die tiefstehende Familie der Ustilagineen, die nur eine einzige Art von Sporen und Conidien bildet und äußerst einfachen Bau aufweist, andererseits die hochorganisierte Familie der Uredineen, die zum Teil Sporen in dreierlei und Conidien in zweierlei Formen, sowie kopulierende Gameten zu bilden vermögen, ferner die Familie der Hymenomyceten, die bei ihrer Differenzierung in Stiel und Hut hochentwickelte Formen herstellen kann, aber der sexuellen Differenzierung ermangelt.

Die genannten anatomischen Funktionen bilden jedoch nicht die genaue Grenze zwischen calciumbedürftigen und calciumnichtbedürftigen Organismen; denn schon die Alge *Spirogyra*, die nur einfache Zellreihen besitzt und keine Sexualorgane produziert, bedarf des Calciums; die Sporenbildung erfolgt hier einfach durch Kopulation zweier Zellen. Ja wir finden das Calciumbedürfnis noch bei weit einfacheren Organismen wie dem *Azotobacter*<sup>1)</sup>, welchen manche den Bakterien bei-

---

wurde, das nun durch Kalkentziehung giftig wirken konnte. *Saprolegnia* gehört zu den höher stehenden Phycomyceten und bildet Oogonien und Antheridien. Was das Magnesiabedürfnis der niederen Pilze betrifft, so reicht relativ sehr wenig Magnesia hin für eine reichliche Entwicklung von Schimmelpilzen und Bakterien. Dieser Umstand ist wohl der Grund, daß Fraenkel Spuren von Magnesia in seinen Nährlösungen übersah und glaubte, für *Bac. coli* und *B. pyocyaneus* sei Magnesia ganz entbehrlich (Centralbl. f. Bakt. 17, 32), und Thun meinte, bei *B. pyocyaneus* könne Magnesia durch Kalk vertreten werden (Arb. Bakt. Inst. Karlsruhe 1898, 375).

<sup>1)</sup> Diese Beobachtung von Gerlach und Vogel ist sowohl von uns bestätigt worden (Bull. Coll. Agric., Tokyo 7, 572) als auch vom Kremeniewska (Bull. Acad. Science, Krakau 1910). Ich beobachtete auch, daß eine 1<sup>0</sup>/<sub>6</sub>ige Lösung von Oxalat in 24 Stunden *Azotobacter*zellen tötet.

zählen, der aber doch eher als eine Rückbildung aus einer höheren Pilzform zu betrachten sein wird, wofür auch neuere Untersuchungen Menels<sup>1)</sup> sprechen, nach denen die Azotobacterzellen Chromatinkörner besitzen, die zusammenfließen, um die Sporen zu geben, von denen mehrere in der Zelle entstehen.

Fernerer Untersuchungen bleibt es vorbehalten, genau die Grenze festzustellen, bei der das Calciumbedürfnis anfängt. Soviel ist indessen sicher, daß schon von den höher stehenden Algen und Pilzen an jede weitere Entwicklung ohne Calcium unmöglich ist, und ferner für das tierische Leben schon auf der Stufe der Amöben und Infusorien Calcium benötigt wird, und deshalb ist dem Calcium — entgegen der Meinung mancher Pflanzenphysiologen — eine ebenso wichtige physiologische Bedeutung beizumessen wie den anderen physiologischen Elementen.

#### Schlußfolgerung.

Neutrales Kaliumoxalat wirkt auch auf die niedersten tierischen Formen giftig, ebenso auf die verschiedensten Pflanzenformen, ausgenommen die tiefstehenden unter den Algen und Pilzen, für die auch ein Calciumbedürfnis nicht existiert. Jene Giftwirkung steht im Zusammenhang mit der physiologischen Bedeutung des Calciums. Beobachtungen an pflanzlichen Objekten zeigen, daß die Giftreaktion des Oxalats sich am Zellkern und an Chloroplasten äußert, woraus eine Bindung von Calcium in diesen Gebilden abzuleiten ist. Physiologische Tatsachen stimmen dafür, daß eine Calciumbindung im Zellkern auch bei den Zellen der tierischen Organismen vorhanden ist.

---

<sup>1)</sup> Arch. f. Protistenkunde 22, 1, 1911; Ref. I, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 31, 303.

# Die Säureflockung von Lecithinen und Lecithin-Eiweißgemischen.

Vorläufige Mitteilung<sup>1)</sup>.

Von

J. Feinschmidt (Charkow).

(Aus dem biologischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban in Berlin.)

(Eingegangen am 23. November 1911.)

In einer Reihe von Arbeiten<sup>2)</sup> wurde gezeigt, daß viele kolloidale Lösungen durch ganz bestimmte Wasserstoffionenkonzentrationen ausgeflockt werden und daß dieses Flockungsoptimum eine für den betreffenden Körper charakteristische Zahl ist. Die bisher untersuchten Körper stellten im wesentlichen Eiweißkörper und Fermente dar.

Wir wollen in dieser Mitteilung versuchen, ein ähnliches Flockungsoptimum für die Lecithine (im weitesten Sinne) festzustellen.

Die Flockungsbedingungen der Lecithinsuspensionen sind in den Arbeiten von Porges und Neubauer<sup>3)</sup> studiert worden,

---

<sup>1)</sup> Die ausführliche Arbeit erscheint in russischer Sprache.

<sup>2)</sup> L. Michaelis, diese Zeitschr. 19, Heft 1 und 2; L. Michaelis und B. Mostynski, ebenda 24, Heft 1 und 2; L. Michaelis und P. Rona, ebenda 27, Heft 1 und 2; L. Michaelis und H. Davidsohn, ebenda 28, Heft 1; L. Michaelis und H. Davidsohn, ebenda 30, Heft 6; L. Michaelis und P. Rona ebenda 28, Heft 3 und 4.

<sup>3)</sup> O. Porges und R. Neubauer, Wiener klin. Wochenschr. 20, 1285, 1907; diese Zeitschr. 7, 152, 1907; Koll.-Zeitschr. 5, 193, 1909.

besonders der Einfluß von Salzen ein- und mehrwertiger Kationen u. dgl. Dagegen ist der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration noch nicht geprüft worden, abgesehen davon, daß eine Wirkung der Säure überhaupt konstatiert wurde.

Unsere Versuchsanordnung war die gleiche, wie die in den zitierten früheren Arbeiten.

Eine durch Schütteln bereitete wässrige Suspension von Lecithin wurde reihenweise mit Regulatoren versetzt derartig, daß der gesamte Salzgehalt der Lösungen innerhalb einer und derselben Reihe konstant gehalten und nur die  $[H^+]$  variiert wurde. Für unser Bereich bedienten wir uns entweder eines Gemisches von Natriumacetat und Essigsäure, oder von Natriumlactat und Milchsäure, oder von chloressigsaurem Natron mit Chlor-essigsäure, ferner wurden auch Reihen mit Salzsäure angestellt. Der Bedingung, den Salzgehalt konstant zu lassen, konnte mit den drei zuerst genannten Regulatoren leicht dadurch genügt werden, daß innerhalb einer Reihe stets die gleiche Menge des Natriumsalzes bei wechselnden Mengen der Säure angewendet wurde. Bei den Versuchen mit Salzsäure ist dieses Prinzip nicht ausführbar; jedoch sind dadurch gröbere Fehler nicht verursacht worden, denn die angewandten HCl-Konzentrationen waren stets so gering, daß die Gesamtkonzentration an Chlor noch so unbedeutend war, daß ihre Wirkung nach Analogie mit früheren Versuchen noch nicht ins Gewicht fallen konnte.

Im einzelnen braucht die Anordnung der Versuchsreihen nicht genauer beschrieben zu werden. Sie ist genau dieselbe wie die von L. Michaelis und P. Rona, sowie L. Michaelis und H. Davidsohn beschriebene. Die Lecithinsuspensionen wurden durch mehrstündiges Schütteln des Lecithins mit destilliertem Wasser hergestellt und in den verschiedensten Konzentrationen mit gleichem Ergebnis benutzt. Der Unterschied der verschiedenen Lecithinkonzentration äußert sich nur darin, daß in allzu verdünnten Emulsionen die Fällung nicht mehr deutlich, in allzu konzentrierten Emulsionen die Fällung zu energisch und die Ausbildung des Optimums daher nicht mehr gut erkennbar wird.

Es mögen die Fällungsoptima verschiedener Lecithinpräparate hier nur summarisch verzeichnet werden.

„Lecithin Merck“	Fällungsoptimum	[H] =	$2 \cdot 10^{-3}$
„Lecithol Riedel“		[H] =	$3 \cdot 10^{-3}$
„Lecithin Agfa“		[H] =	$2-3 \cdot 10^{-3}$
Alkoholischer Menschenherzextrakt		[H] =	$1-2 \cdot 10^{-3}$
Alkoholischer Menschenleberextrakt		[H] =	$2 \cdot 10^{-4}$
Alkoh. Extrakt aus Hammelblutkörper.		[H] =	$1-2 \cdot 10^{-2}$

Beispiel eines ausführlichen Versuchsprotokolls.

Röhrchen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\frac{n}{10}$ -Natriumlaetat	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Milchsäure (Röhrchen 1 bis 5 $\frac{n}{1}$ , Röhrchen 6 b. $10 \frac{n}{6}$ )	$\frac{n}{1} \rightarrow$ 3,8	3,1	2,5	2	1,6	$\frac{n}{6} \rightarrow$ 6,4	5,1	4,1	3,4	2,7
Destill. Wasser	5,2	5,9	6,5	7	7,4	2,6	3,9	4,9	5,6	6,3
Lecithinsuspension „Merck“	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resultat n. 1 Min.	klar	klar	klar	klar	klar	trübe	klar	klar	klar	klar
„ „ 3	„	„	„	„	„	„	klar	trübe	„	klar
„ „ 5	„	„	„	„	trübe	„	„	trübe	„	„
„ „ 8	„	„	„	„	trübe	„	„	„	„	„
„ „ 10	„	„	„	„	„	+	+	„	„	„
„ „ 20	„	„	„	„	„	++	++	„	„	„
„ „ 30	„	„	„	„	„	+++	+++	+	„	„
„ „ 60	„	„	„	„	+	+++	+++	+++	trübe	„
„ „ 90	„	„	„	„	++	+++	+++	+++	+	„
„ „ 180	„	„	„	„	++	+++	+++	+++	++	„
„ „ 20 Stdn.	„	„	„	„	+++	+++	+++	+++	+++	„
						Optim.				

+ bedeutet Flockung, die Zahl der + gibt die Intensität der Flockung an.  
 Flockungsoptimum Röhrchen 6; hier ist [H] berechnet =  $1,8 \cdot 10^{-3}$   
 mit Gasketten gemessen =  $1,5 \cdot 10^{-3}$ .

Die Bestimmung des Fällungsoptimums bei den Lecithinen ist vielleicht nicht ganz so scharf wie die mancher Eiweißkörper, aber immerhin doch noch ziemlich fein. In unseren Reihen läßt sich das Fällungsoptimum auf 1 bis 2 Röhrchen bestimmen; für eine und dieselbe Lecithinsorte erhält man konstante Werte, unabhängig von der Art des Regulators und von der Konzentration des Lecithins; nur bedarf es einer gewissen (1%igen) Lecithinsuspension, um den Punkt möglichst scharf zu erkennen. Bei zu hoher Lecithinkonzentration wird die Flockung zu energisch und daher ihr Optimum etwas verwaschen.



Einfluß der Neutralsalze.

Versuch Nr. 27.

A.

Röhre	I	II	III	IV	V	VI	VII
Natriumacetat . . .	$\frac{2}{10}$ 1	1	1	1	1	1	1
Essigsäure . . . . .	$\frac{2}{1}$ 6,25	3,12	1,56	$\frac{2}{10}$ 7,8	3,9	1,95	0,98
Wasser . . . . .	2,75	5,88	7,44	1,2	5,1	7,05	8,02
Lecithin Merck . . .	1	1	1	1	1	1	1
Nach 1 Minute	klar	trübe	klar	klar	klar	klar	klar
„ 5 Minuten	„	Flockg.+	trübe	„	„	„	„
„ 15 „	„	+++	„	„	„	„	„
„ 30 „	„	+++	„	„	„	„	„
„ 45 „	„	+++	ger. Flockg.+	„	„	„	„
„ 60 „	„	+++	++	„	„	„	„
„ 24 Stunden	trübe	+++	+++	„	„	„	„
		Optim.					

B.

Röhre	I	II	III	IV	V	VI	VII
Natriumacetat . . . .	$\frac{2}{40}$ 1	1	1	1	1	1	1
Essigsäure . . . . .	$\frac{2}{1}$ 6,25	3,12	1,56	$\frac{2}{10}$ 7,8	3,9	1,95	0,98
Wasser . . . . .	1,75	4,88	6,44	0,2	4,1	6,05	7,02
Chlornatr. 3fach norm.	1	1	1	1	1	1	1
Lecithin Merck . . .	1	1	1	1	1	1	1
Nach 1 Minute	stark trübe	st. trübe	st. trübe	st. trübe	st. trübe	st. trübe	st. trübe
„ 15 Minuten	„	„	„	„	„	„	„
„ 1 Stunde	„	„	„	„	„	„	„
„ 4 Stunden	„	„	„	„	„	„	„
„ 24 „	geflockt	geflockt	geflockt	geflockt	geflockt	geflockt	geflockt

Versuch Nr. 28.

A.

Röhre	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Natriumlaetat . . . .	$\frac{2}{10}$ 1	1	1	1	1	1	1	1	1
Milchsäure . . . . .	$\frac{2}{1}$ 5	2,5	1,25	$\frac{2}{10}$ 6,25	3,12	1,56	$\frac{2}{100}$ 7,8	3,9	1,95
Wasser . . . . .	4	6,5	7,77	2,75	5,88	7,44	1,2	5,1	7,05
Lecithol Riedel . . .	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Nach 1 Minute	klar	klar	trübe	trübe	trübe	klar	klar	klar	klar
„ 3 Minuten	„	„	„	Flockg.+	„	„	„	„	„
„ 5 „	„	„	Flockg.+	++	„	„	„	„	„
„ 10 „	„	„	+++	+++	„	„	„	„	„
„ 20 „	„	„	+++	+++	„	„	„	„	„
„ 30 „	„	„	+++	+++	+	„	„	„	„
„ 1 Stunde	„	„	+++	+++	++	„	„	„	„
„ 2½ Stunden	„	„	+++	+++	+++	„	„	„	„
„ 24 „	„	„	+++	+++	+++	„	„	„	„
				Optim.!					

## B.

Die gleiche Reihe, Zusatz von je 1 ccm dreifachnormalen Chlornatriums und entsprechend weniger Wasser. In sämtlichen Röhren tritt sofort sehr starke Trübung ein; nach 3 Stunden ist noch keine Spur von Flockung wahrzunehmen. Nach 24 Stunden sind alle Röhren geflockt.

Vergleicht man die Wirkung gleicher  $[H^+]$  bei gleichem Gehalt an Neutralsalz, so findet man eine Erscheinung, welche der entsprechenden Erscheinung beim denaturierten Albumin<sup>1)</sup> in gewisser Beziehung, aber nicht in allen, ähnlich ist. Die neutralsalzreichen Lecithinsuspensionsgemische zeigen die entstehende Trübung schneller und sehr viel intensiver als die salzfreien, trotzdem tritt die wirkliche Flockung bei den chlornatriumfreien bedeutend früher ein. Allmählich aber flocken auch die salzreichen Röhren im weiten Umfange um das Flockungsoptimum beiderseits in kaum unterscheidbarer Weise. Der Salzzusatz bewirkt also erstens eine Verdichtung der Trübung, zweitens im scheinbaren Gegensatz dazu eine Hemmung der Flockung, drittens bewirkt er, daß das Optimum verwaschen wird.

Nunmehr wurden entsprechend der von uns wiederholt beschriebenen Anordnung einige elektrische Überführungsversuche angestellt.

## Versuch Nr. 29 (Überführungsversuch).

+ Ag. ClNa	$\frac{1}{10}$ -Natriumacetat 5 ccm $\frac{1}{100}$ -Essigsäure 5 „ Wasser 40 „	$\frac{1}{10}$ -Natriumacetat 2,5 ccm $\frac{1}{100}$ -Essigsäure 2,5 „ Lecithinsuspension Merck 20 „	$\frac{1}{10}$ -Natriumacetat 5 ccm $\frac{1}{100}$ -Essigsäure 5 „ Wasser 40 „	Cu in CuCl <sub>2</sub>
Wanderung anodisch sehr deutlich.				
+ Ag. ClNa	$\frac{1}{40}$ -Natriumlactat 2 ccm $\frac{1}{1}$ -Milchsäure 20 „ Wasser 40 „	$\frac{1}{40}$ -Natriumlactat 1 ccm $\frac{1}{1}$ -Milchsäure 10 „ Lecithinsuspension Merck 20 „	$\frac{1}{40}$ -Natriumlactat 2 ccm $\frac{1}{1}$ -Milchsäure 20 „ Wasser 40 „	Cu in CuCl <sub>2</sub>
Wanderung kathodisch aber nicht sehr deutlich.				
+ Ag. ClNa	$\frac{1}{1}$ -Milchsäure 20 ccm Wasser 40 „	$\frac{1}{1}$ -Milchsäure 10 ccm Lecithinsuspension Merck 20 „	$\frac{1}{1}$ -Milchsäure 20 ccm Wasser 40 „	Cu in CuCl <sub>2</sub>
Wanderung kathodisch sehr deutlich.				

<sup>1)</sup> L. Michaelis und P. Rona, diese Zeitschr. 27, Heft 1 und 2.

Daraus ergibt sich, daß die theoretische Bedeutung des Flockungsoptimums der Lecithine dieselbe ist, wie bei den anderen Körpern. Das Flockungsoptimum stellt den isoelektrischen Punkt dar; bei höheren H<sup>+</sup>-Konzentrationen wandert das Lecithin kathodisch, bei niederen anodisch.

Versuche mit eiweißhaltigen Lecithinsuspensionen.

Von besonderem Interesse sind nun die Eigenschaften der eiweißhaltigen Lecithinsuspensionen.

Versetzt man eine Lecithinsuspension mit relativ sehr geringen Mengen von Blutserum, so machen sich, wie aus den folgenden Protokollen zu sehen ist, zwei Erscheinungen bemerkbar: erstens werden die durch Ansäuerung erzeugten Fällungen viel massiver, voluminöser, flooken bedeutend energischer aus; die Flockung ist auch am Anfang des Versuchs nicht nur auf 1 oder 2 Röhren beschränkt, sondern auf eine größere Reihe von Röhren ausgedehnt. Betrachten wir das mittlere dieser Röhren als das Optimum, so kommt zweitens hinzu, daß das Fällungsoptimum nach der weniger sauren Seite hin verschoben ist, und zwar um so mehr, je mehr Serum wir hinzufügen. Die Fällungen können nicht etwa als Globulinfällungen gedeutet werden, denn die zugefügten Serum-mengen waren auf jeden Fall so gering, daß ohne Lecithin bei keiner Acidität ein sicher merklicher Niederschlag entstand.

Versuch Nr. 31.

Röhre	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Natriumlactat . .	<sup>n/40</sup> 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Milchsäure . . . .	<sup>n/1</sup> 10	5	2,5	1,25	<sup>n/10</sup> 6,25	3,12	1,56	<sup>n/100</sup> 7,8	3,9	1,95	0,98	0,49
Wasser . . . . .	0	4	6,5	7,75	2,75	5,88	7,44	1,2	5,1	7,05	8,02	8,51
Lecithin Merck . .	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Nach 1 Minute	klar	klar	klar	klar	klar	trübe	klar	klar	klar	klar	klar	klar
„ 5 Minuten	„	„	„	„	„	„	trübe	„	„	„	„	„
„ 10 „	„	„	„	„	„	Flockg.+	„	„	„	„	„	„
„ 15 „	„	„	„	„	„	++	„	„	„	„	„	„
„ 30 „	„	„	„	„	„	+++	„	„	„	„	„	„
„ 1 Stunde	„	„	„	„	„	+++	Flockg.+	„	„	„	„	„
„ 14 Stunden	„	„	„	„	„	Optim.!	+++	„	„	„	„	„

Versuch Nr. 32.

Zu der gleichen Reihe wie im Versuche Nr. 31 wird noch je 1 ccm 10fach mit Wasser verdünntes menschliches Serum zugesetzt<sup>1)</sup>; es tritt sofort starke massige Flockung in den Röhren X bis XII ein; die Röhren

<sup>1)</sup> D. h. ca. 10/ige wässrige Lecithinemulsion wird mit 10% ihres Volumens Serum versetzt und von dieser Mischung je 1 ccm statt 1 ccm reiner Lecithinemulsion verwendet.

VII bis IX sind trübe, auch nach 24 Stunden ist in ihnen keine Flockung eingetreten.

#### Versuch Nr. 33.

Bei Zusatz von je 1 cem 20fach verdünntem Serum sind die Röhren X bis XII sofort stark geflockt; VII bis IX trübe; nach 24 Stunden ist das Röhren IX auch geflockt.

#### Versuch Nr. 34.

Dieselbe Reihe mit je 1 cem 100fach verdünntem Serum ergibt sofortige Flockung in den Röhren IX bis XII; in den übrigen tritt keine Flockung auch nach 24 Stunden ein.

#### Versuch Nr. 35.

In der gleichen Reihe tritt unter Zusatz von 1000fach verdünntem Serum sofortige Flockung in den Röhren VII bis XII ein.

#### Versuch Nr. 36.

Bei Zusatz zu der gleichen Reihe von 10000fach verdünntem Serum tritt sofort starke Flockung in den Röhren VI bis IX ein.

#### Versuch Nr. 37.

Bei Zusatz von 100000fach verdünntem Serum zu der gleichen Reihe findet eine zwar sehr energische und massige Flockung statt, die sich aber nur in den Röhren VI und VII abspielt; die anderen bleiben auch noch nach 24 Stunden klar. In dieser Verdünnung hat das Serum also in bezug auf die Verschiebung des Fällungsoptimums keinen Einfluß mehr.

#### Versuch Nr. 38.

Röhre	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Natriumlactat	$\frac{1}{40}$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Milchsäure . .	$\frac{5}{1}$	2,5	1,25	$\frac{6,25}{10}$	3,12	1,56	$\frac{7,8}{100}$	3,9	1,95	0,98	0,49	0,25	0,12
Wasser . . .	3	5,5	6,75	1,75	4,88	6,44	0,2	4,1	6,05	7,02	7,51	7,75	7,88
Lecithol Riedel	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
				Optim.!									

Die Flockung tritt in der Röhre IV nach 10 Minuten ein; nach 15 Minuten flockt auch das Röhren III; die übrigen bleiben noch nach 24 Stunden klar.

#### Versuch Nr. 39.

Setzt man zu der gleichen Reihe je 1 cem 2000fach verdünntes Serum zu, so tritt sofort eine starke Flockung in den Röhren V bis IX ein, eine geringe in dem Röhren X; nach 5 Minuten ist die Flockung auch im Röhren IV zu sehen, nach 10 Minuten im Röhren III, nach einer Stunde sind die Röhren III bis XIII geflockt.

#### Versuch Nr. 40.

Die gleiche Reihe mit je 1 cem 500fach verdünntem Serum ergibt sofortige massige Flockung in den Röhren VII bis X, nach  $\frac{1}{2}$  Stunde ist auch das Röhren VI geflockt.

Es ist also durch Vermischen von Lecithin mit Eiweiß ein neuer Komplex entstanden mit genau bestimmbar $\ddot{u}$ n Eigenschaften, und wir haben hier eine objektive Grundlage f $\ddot{u}$ rdie sogenannten Lecithin-Eiweiß-Verbindungen, die im lebenden Organismus zweifellos eine hervorragende Rolle spielen. Sie zeichnen sich durch eine ganz besondere Empfindlichkeit gegen $\ddot{u}$ ber erh $\ddot{o}$ hten Wasserstoffkonzentrationen aus, und es ist wohl anzunehmen, da $\beta$  diese Lecithin-Eiweiß-Komplexe das Substrat f $\ddot{u}$ r alle die Zustands $\ddot{a}$ nderungen sind, die nach neuen Untersuchungen in der Physiologie der Muskeln und Nerven eine so gro $\beta$ e Rolle spielen.

#### Zusammenfassung.

Die w $\ddot{a}$ sserigen Suspensionen der verschiedenen „Lecithinpr $\ddot{a}$ parate“ haben bei ganz bestimmten Wasserstoffionenkonzentrationen ein Flockungsoptimum, das mit dem isoelektrischen Punkt identisch ist. Dasselbe liegt bei ziemlich stark saurer Reaktion, je nach dem Lecithinpr $\ddot{a}$ parat, zwischen etwa  $10^{-2}$  und  $10^{-4}$ . Neutralsalze machen die Tr $\ddot{u}$ bung der Suspensionen st $\ddot{a}$ rker, hemmen aber die eigentliche Flockung und machen ihr Optimum verwaschen. Durch Vermischen von Lecithin mit Eiweiß entsteht ein neuer Komplex, der erstens viel energischer und gr $\ddot{o}$ ber ausflockt, zweitens das Optimum im Vergleich zum reinen Lecithin nur verwaschen zeigt und drittens nach der weniger sauren Seite hin verschoben hat<sup>1)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Anmerkung. In dieser Arbeit wird zum erstenmal gezeigt, wie das Flockungsoptimum eines s $\ddot{a}$ ureempfindlichen Kolloids durch Beimengung eines anderen Kolloids beeinflusst wird. Dies ist der Anfang einer Serie von Untersuchungen, deren Notwendigkeit sich immer mehr aufdr $\ddot{a}$ ngte und durch die Befunde von Pekelharing und Ringer (Zeitschr. f. physiol. Chem. 1911) best $\ddot{a}$ tigt wurde, die die Abh $\ddot{a}$ ngigkeit der Wanderungsrichtung des Pepsins von Eiwei $\beta$ beimengungen erkannten.

L. Michaelis.

# Über die Prodigiosusgelatinase.

Von

Franz von Gröer.

(Aus dem hygienischen Institut und dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1911.)

Mit 4 Figuren im Text.

Nachdem zuerst Bitter<sup>1)</sup> ein proteolytisches Enzym in den Choleravibrionen gefunden hatte, wurde später von Fermi<sup>2)</sup> und anderen Forschern der Nachweis geliefert, daß auch andere Bakterien, deren Kulturen, wie der Augenschein lehrt, die Gelatine verflüssigen, diese Verflüssigung durch Enzyme bewirken, die von den Bakterien selbst abzutrennen sind. Filtriert man die Bouillon-Kulturen von Prodigiosus, Pyocyaneus oder irgend einer anderen gelatineverflüssigenden Bakterienart, so verflüssigen die erhaltenen keimfreien Filtrate die Gelatine, wobei sie in ihrer Abhängigkeit von Temperatur, Reaktion u. a. ein Verhalten zeigen, wie man es auch sonst bei Enzymen findet.

Bei einem Vergleich der Wirkungen, die man von den Kulturfiltraten verschiedener Bakterien erhält, ergeben sich weiterhin, wie aus den Untersuchungen von Fermi, Mavrojannis<sup>3)</sup> u. a. hervorgeht, Unterschiede, die zu der Annahme veranlassen, daß die gelatineverflüssigenden Enzyme verschiedener Bakterien ihrem Wesen nach verschieden sind.

Bei der Bedeutung, die eine genaue Kenntnis der Bakterienfermente besitzt, erscheint es wünschenswert, die

---

<sup>1)</sup> Arch. f. Hygiene 5, 241, 1886.

<sup>2)</sup> Arch. f. Hygiene 10, 1890, Arch. f. Hygiene 14, 1892; Centralbl. f. Bakt. 7 u. 10 1890, 14, 1892.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Hygiene 45, 108, 1903.

Gelatinasen der verschiedenen Bakterien besser als bisher zu charakterisieren.

Ein Versuch nach dieser Richtung hin wurde im hiesigen Laboratorium bereits von Mesernitzky<sup>1)</sup> gemacht. Er untersuchte die Prodigiosusgelatinase in ihrem Verhalten zur Temperatur und Reaktion, wobei er zu ähnlichen Ergebnissen wie Fermi kam und stellte zum ersten Male einige der Produkte dar, die durch Prodigiosusgelatinase aus der Gelatine gebildet werden.

Die vorliegende Arbeit soll einen Teil der Erfahrungen Mesernitzky's erweitern. Es sollte zunächst das Verhalten der Prodigiosusgelatinase untersucht werden, um zu erfahren, unter welchen Bedingungen man die wirksamsten Fermentlösungen erhält. Dann sollte weiter die Abhängigkeit ihrer Wirkung von der Temperatur und dem Verhältnis zwischen Enzym- und Gelatinemenge festgestellt werden.

Für diesen Zweck mußte eine Methode gewählt werden, die gestattet, vergleichbare Werte für die Stärke der Fermentwirkung zu erhalten.

Der Methode, welche von Fermi<sup>2)</sup> bei seinen Versuchen angewandt und später von anderen wie z. B. Mett und Linossier,<sup>3)</sup> Malfitano,<sup>4)</sup> Schouten<sup>5)</sup> in verschiedener Weise abgeändert wurde, haften gewisse Mängel an. Fermi läßt die Gelatine in kleinen Proberöhrchen erstarren und überschichtet sie dann mit der fermenthaltigen Flüssigkeit. Nach einiger Zeit beobachtet man die eintretende Wirkung, die durch die Höhe der schon verflüssigten Gelatineschicht, die sich über der noch festen Gesamtmenge befindet, ausgedrückt wird. Für quantitative Versuche kann zwar diese Höhe gemessen und in Millimetern ausgedrückt werden, solche Messungen sind aber mit grober Ungenauigkeit verbunden, sodaß sie bei feineren Untersuchungen kaum als Maß für die Fermentwirkung dienen können. Außerdem ist nach Duclaux der größte Nachteil dieser Methode der, daß die fermenthaltige Flüssigkeit und die Gelatine nur eine Kontaktfläche besitzen, wodurch keine hinreichende Sicherheit für die stete Erneuerung der Fermentwirkung geboten werde. Ist dieser Einwand auch für die Bewertung der von Fermi gemachten Beobach-

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 29, 104, 1910.

<sup>2)</sup> Arch. f. Hygiene 55, 1906.

<sup>3)</sup> Siehe F. Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzyme, Jena 1907.

<sup>4)</sup> Ann. de l'Inst. Pasteur 14, 1900. — C. rend. Soc. Biolog. 55, 841, 1900.

<sup>5)</sup> Centralbl. f. Bakt. 2, 18, 1907.

tungen ziemlich belanglos, so gewinnt er doch mit dem Augenblick, wo man die Fermi'sche Methode zu genauen, messenden Versuchen verwenden will, an Bedeutung, indem, wie Euler<sup>1)</sup> den gleichen Einwand gegenüber der Methode von Mett formuliert, die Reaktionsgeschwindigkeit stark beeinflusst wird durch Diffusion des Enzyms zum Querschnitt der Gelatine, und durch die Geschwindigkeit, mit der die Reaktionsprodukte sich von der Oberfläche entfernen.

Ähnliches läßt sich gegen alle Abänderungen der Fermi'schen Methode einwenden. Alle haben weiter den Nachteil, daß die Einzelbeobachtung sich über lange Zeit erstreckt, und daß man für jeden Versuch eine größere Reihe von Proben aufstellen muß.

Auf Anregung von Prof. Röhmann benutzte ich für meine Untersuchung die Methode der relativen inneren Reibung in der von Ostwald angegebenen Ausführung.

Die Benutzung dieser Methode war nahegelegt durch die Beobachtung, daß die Gelatine durch die Enzymwirkung aus dem gelatinösen in den flüssigen Zustand übergeht, sowie durch die schon bei anderen Versuchen gemachte Erfahrung, daß mit der chemischen Veränderung der Eiweißlösungen sich auch ihre innere Reibung verändert. Mit der hydrolytischen Spaltung der Eiweißlösungen nimmt die innere Reibung ab, wie dies für die Labwirkung von Laqueur und Sackur, für die Pepsinwirkung von Spriggs gezeigt wurde; bei den koagulierenden Reaktionen, wie z. B. bei der Danilewski'schen Reaktion nimmt sie zu (Herzog<sup>2)</sup>). Diese Veränderungen lassen sich mit Hilfe des Ostwald'schen Verfahrens in ebenso einfacher wie genauer Weise verfolgen.

Man erhält durch dieses eine in Zahlen ausgedrückte Darstellung der Fermentwirkung, die sich für alle messenden und vergleichenden Untersuchungen außerordentlich gut eignet. Diese Möglichkeit, in Zahlen genau den Verlauf der Fermentwirkung auszudrücken, ist einer der Hauptvorteile der Methode. Von nicht geringerer Bedeutung ist aber auch, daß sie uns an einer und derselben Lösung das Fortschreiten der Fermentwirkung zu beobachten gestattet. Dabei ist die Dauer jedes Experimentes eine kurze. Daß dies für Verdauungsflüssigkeiten, die sich schwer ganz aseptisch halten lassen, von großem Vorteil ist, braucht kaum näher erörtert zu werden.

---

<sup>1)</sup> Allg. Chemie der Enzyme. Wiesbaden 1910, 214.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 305, 1903.



Daß man aber auch bei Verwertung der Ergebnisse, die man mit dieser Methode erhält, eine gewisse Vorsicht walten lassen muß, wird sich später zeigen.

### Methodik.

#### 1. Bereitung der Gelatine.

Als Gelatine benutzte ich zuerst eine 5%ige Lösung der käuflichen Gelatine in destilliertem Wasser, welcher als Antisepticum 1% Fluornatrium zugesetzt worden war. Eine solche Lösung kann in flüssigem Zustande im Brutschrank bei 22° dauernd aufbewahrt werden, ist nach dem Filtrieren vollkommen klar und reagiert für Lakmus amphoter und für Lakmoid alkalisch, während die käufliche Gelatine für ersteres bekanntlich relativ stark sauer reagiert. Es lassen sich aber, trotz dieser Vorteile gegen die Anwendung der Fluornatriumgelatine Bedenken erheben, die nicht ohne weiteres unberücksichtigt bleiben können.

Als Elektrolyt muß zunächst das Fluornatrium einen Einfluß auf die innere Reibung ausüben. Die Fluornatriumgelatine weist auch tatsächlich eine höhere Viscosität auf, als die reine Gelatine. Ferner war auch ein schädigender Einfluß des Fluornatriums auf das Ferment und seine Wirkung zu beobachten.

Aus diesen Gründen bediente ich mich später meistens der reinen Gelatine, die ganz ohne Antisepticumzusatz bereitet wurde.

Sie wurde mit  $\frac{1}{4}$  Normalnatronlauge versetzt, bis sie für Phenolphthalein annähernd neutral reagierte. Der Verbrauch der Natronlauge entsprach dabei 1 ccm  $\frac{1}{4}$  Normal NaOH für 20 ccm 5%ige Gelatinelösung. Die so bereitete Gelatine wurde filtriert, im Dampftopf sterilisiert, während der Versuchszeit im Eisschrank aufbewahrt und nach Bedarf im nicht kochenden Wasserbade in kleinen Mengen gelöst. Die Gelatinelösung wurde mit Hilfe der Viscositätsmethode von Zeit zu Zeit kontrolliert. Sie behielt stets ihre ursprüngliche innere Reibung. Der Mangel eines Antisepticums hatte ebenfalls keine Bedeutung, da ich, soweit es beim chemischen Arbeiten möglich ist, unter aseptischen Kautelen arbeitete, vor allem aber, weil die einzelnen Versuche sich nicht über eine Stunde ausdehnten, und während dieser Zeit auch eine nicht streng keimfreie Gelatinelösung sich bezüglich ihrer Viscosität nicht veränderte.

## 2. Gewinnung der Gelatinase.

Was die Gewinnung der Gelatinase anbetrifft, so habe ich mich im großen und ganzen an die Erfahrungen Mesernitzky's gehalten. Ich arbeitete mit sehr wirksamen *Prodigiosus*-stämmen, die ich durch langdauernde elektive Züchtung gewann. Von den auf 10% iger Nährgelatine gezüchteten Kolonien wurden die am stärksten und schnellsten verflüssigenden abgeimpft, und weiter auf dieselbe Weise gezüchtet. Dies wurde 3 bis 4 mal wiederholt, und die so gewonnenen *Prodigiosus*-stämmen dienten als Ausgangsmaterial für Bouillon- bzw. Massenkulturen. Während der ganzen Untersuchungszeit arbeitete ich mit immer frisch gewonnenen Stämmen, die sich durch ihre leuchtende Farbe und ihren Fermentreichtum auszeichneten.

Um die Fermente aus Bouillonkulturen zu gewinnen, wurden etwa 50 ccm alkalisch reagierender Nährbouillon mit einer Oese *Prodigiosus* geimpft und bei 22° im Brutschrank stehen gelassen. Die Flüssigkeit färbte sich alsbald rötlich und zeigte schon nach 3 Tagen deutliche Fermentwirkung. Das Optimum der Wirkung konnte, wie schon Mesernitzky angegeben hat, bei etwa 3 Wochen alten Kulturen erreicht werden. Dementsprechend wurde stets mit 21 bis 25 Tage alten Kulturen gearbeitet. Um sie von den Bakterien zu befreien, filtrierte ich sie zunächst durch ein Berkefeld-Filter. Später bediente ich mich zu diesem Zwecke auch des Zentrifugierens. Die Filtrate waren zwar stets, wie durch Plattenverfahren jedesmal gezeigt werden konnte, vollkommen keimfrei, was durch Zentrifugieren nicht immer in dem Maße zu erreichen war. Doch bevorzugte ich die letztere Methode, weil sie rascher zum Ziele führte und etwas wirksamere Lösungen lieferte (s. u.). Wie ich mich überzeugt habe, wurden die Versuche durch einen etwaigen Keimgehalt der Zentrifugate nicht beeinflusst.

Alle Lösungen, ob sie durch Filtrieren oder Zentrifugieren gewonnen wurden, waren vollkommen klar, reagierten für Lakmoid deutlich alkalisch und zeichneten sich durch einen besonderen, süßlichen, nicht unangenehmen Geruch aus.

Sie wurden tagelang entweder unter Zusatz von Fluornatrium oder ohne dieses auf Eis aufbewahrt. Sie blieben vollständig klar und büßten an ihrer Wirksamkeit nichts ein.

Um die Gelatinase aus den Bakterienleibern zu gewinnen, wurden aus den gleichen Stämmen, die sich am wirksamsten erwiesen, Massenkulturen auf Agar in sog. Kolle'schen Schalen in üblicher Weise angelegt. Diese ließ ich 5 bis 6 Tage wachsen, was vollkommen genügte, um sehr üppige und stark gefärbte Kulturen zu erzeugen. Sie wurden dann vom Agar abgekratzt und entweder frisch — selbstverständlich unter allen Kautelen der Asepsis — oder getrocknet zur Extraktion verwendet.

### 3. Ausführung der Viscositätsbestimmungen.

Zur Ausführung der Viscositätsbestimmungen bediente ich mich des Ostwald'schen Viscosimeters, wie er in den „Physico-Chemischen Messungen“ von Ostwald-Luther (2. Aufl.) beschrieben ist.

Ich benutzte gleichzeitig 3 Viscosimeter, die ich mit *A*, *B* und *C* bezeichnen möchte. Alle 3 hatten Kapillaren von etwa 12 cm Länge und 0,5 mm Durchmesser. Das Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeit betrug stets 11 ccm. Die Temperatur der Thermostaten war + 32°. Die Durchflußzeiten ( $t_0$ ) des destillierten Wassers waren für Viscosimeter *A* 54, für *B* 48 und für *C* 40 Sekunden.

Die zu untersuchende Flüssigkeit war in unserem Falle stets ein Gemisch von Gelatine und Fermentlösung, und zwar verwendete ich stets 10 ccm von ersterem und 1 ccm der letzteren. Zur Bestimmung der „Anfangsviscosität“ der Gelatine zur Zeit 0, d. h. zu der Zeit, wo die Wirkung des Fermentes begann, setzte ich zu den 10 ccm Gelatine 1 ccm der Flüssigkeit, die als Lösungsmittel für das Ferment diente, also z. B. der Nährbouillon. Somit beziehen sich die Werte für die Anfangsviscosität auf ein Gemisch von 10 ccm 5%ige Gelatine und 1 ccm Nährbouillon, bzw. der zu der Extraktion der Bakterien verwandten Flüssigkeit.

Dieselben Lösungsmittel wurden auch zur Verdünnung der Stammfermentlösung verwandt, wenn es darauf ankam, verschiedene Mengen desselben Fermentes in ihrer Wirksamkeit zu vergleichen.

Das spezifische Gewicht der zu untersuchenden Flüssigkeit wurde für das zur Bestimmung der Anfangsviscosität verwandte

Gelatinegemisch mit Hilfe eines Ostwald'schen Pyknometers bei der Versuchstemperatur (+ 32 °) bestimmt.

Bei der Ausführung der Bestimmungen der Durchflußzeiten sind folgende wichtige Vorsichtsmaßregeln genau zu beachten:

1. Die in das Viscosimeter gebrachte Flüssigkeit muß, ehe eine Bestimmung ausgeführt werden kann, die Temperatur des Thermostaten annehmen, wozu in unserem Falle, wenn nicht eine vorherige Erwärmung auf anderem Wege herbeigeführt werden sollte, 15 Minuten ausreichen.

2. Auch muß das Ansaugen der Gelatinelösung langsam und vorsichtig geschehen, damit die Lösung nicht in starke Bewegung gerät und sich keine Luftblasen bilden. Die Erfahrung zeigt, daß nur dann übereinstimmende und sichere Werte erhalten werden, wenn die Gelatinelösung vor Beginn der Bestimmung 15 Minuten ruhig im Viscosimeter gestanden hatte. Das ist besonders wichtig für die Bestimmung der Anfangsdurchflußzeit der Gelatine (ohne Ferment). Die in stärkere Bewegung gesetzte Gelatinelösung gibt bald höhere, bald niedrigere Werte. Will man bei den Anfangsviscositätsbestimmungen mehrere Versuche mit derselben Flüssigkeit zur Kontrolle ausführen, so muß man zwischen jeder Bestimmung mindestens eine Zeit von 15 Minuten warten, da sonst wechselnde Werte gefunden werden.

Was nun den Gang der Versuche im einzelnen anbetrifft, so wurde folgendermaßen verfahren: Nachdem die Durchflußzeit für die Gelatine mit fermentfreier Kontrollflüssigkeit (Wirkungszeit 0) festgestellt war, wurden 10 ccm Gelatine und 1 ccm der fermenthaltigen Flüssigkeit in das Viscosimeter gebracht und 15 Minuten lang gewartet. Am Ende dieser „Wirkungszeit“ wurde die Flüssigkeit vorsichtig angesogen und die Durchflußzeit bestimmt. Falls das Ferment wirkte, nahm dieselbe im Vergleich zu der Anfangsdurchflußzeit ab. Dann wurde wieder 15 Minuten gewartet und wiederum am Ende derselben eine Durchflußzeitbestimmung gemacht. Diese entsprach der Wirkungszeit von 30 Minuten. Desgleichen wurden die Bestimmungen nach der Wirkungszeit von 45 und 60 Minuten gemacht, so daß jedes Experiment 4 an einer und derselben Flüssigkeit gefundene Daten enthielt und im ganzen eine Stunde dauerte. Aus den gefundenen Durchflußzeiten wurde die relative innere Reibung nach der bekannten Formel  $\eta = \frac{s_1 t_1}{t_0}$  ausgerechnet, in der  $s_1$  das spezifische Gewicht der Gelatinelösung,  $t_0$  die Durchflußzeit für destilliertes Wasser und  $t_1$  die Durchflußzeit der betreffenden Gelatinelösung zu Beginn bzw. während der fortschreitenden Fermentation bedeutet. Die ge-

fundenen Werte wurden als Maß für die eingetretene Gelatinespaltung tabellarisch zusammengestellt.

Ehe ich nun zu der Besprechung meiner Versuche und deren Ergebnisse übergehe, muß ich noch auf einen Einwand, der gegen die von mir geübte Methodik leicht erhoben werden kann, eingehen. Ich arbeitete nämlich mit ziemlich weiten und kurzen Capillaren, was die Durchflußzeiten wesentlich abkürzte. Darunter hat natürlich die Exaktheit der Viscositätberechnung zu leiden. Die relative innere Reibung einer Gelatinelösung von der für den Nachweis der Fermentwirkung nötigen Konzentration ist aber eine sehr hohe. Hätte ich sehr enge Capillaren benutzt, d. h. die Durchflußzeiten wesentlich verlängert, so würde ich mit einem anderen Fehler, der mir von größerer Bedeutung schien, zu rechnen haben. Es läßt sich nämlich die Fermentwirkung während der Bestimmungszeit nicht unterbrechen, ohne gleichzeitig die innere Reibung zu beeinflussen. Sollte nun diese Zeit sich wesentlich mehr wie über 3 Minuten erstrecken, so müßte man mit der Fermentwirkung während der Beobachtungszeit zu rechnen haben. Von diesem Gesichtspunkte aus würde sich vielleicht für spätere Versuche eine andere, weniger zähe Eiweißlösung besser für die Viscositätsmethode als die Gelatine eignen.

Was die Empfindlichkeit der Viscositätsmethode gegenüber sehr kleinen Fermentmengen anbetrifft, so ließ sich eine Abnahme der inneren Reibung feststellen, wenn Pankreon in einer Verdünnung von 1 : 10000 auf die 5%ige Gelatinelösung während 15 Minuten eingewirkt hatte.

### Versuche.

#### 1. Über die Wirksamkeit des Bouillonfiltrats im Vergleich zu der des Bouillonzentrifugats.

Ein Unterschied in der Wirkung zwischen Bouillonfiltrat und Bouillonzentrifugat ist von zwei Erwägungen aus zu erwarten.

Zunächst kommt in Betracht, daß die Filterwandung als Adsorbens wirken kann. Sie kann ein Enzym bei der Filtration durchlassen oder mehr oder weniger zurückhalten. Letzteres ist z. B. der Fall, wenn Trypsin durch ein Chamberland-Filter filtriert wird. Es fragte sich daher, ob nicht auch die Prodi-

giosugelatinase bei der Filtration zum Teil adsorbiert wird. Würde das der Fall sein, dann mußte das Bouillonfiltrat sich weniger wirksam als das Bouillonzentrifugat erweisen.

Zweitens fragte es sich, ob die Forderung der vollkommenen Keimfreiheit des Bouillonfiltrats auch für unsere Methode wesentlich und nicht ein Keimgehalt des Bouillonzentrifugats von merkbarem Einfluß auf die Fermentwirkung und deren Verlauf ist.

Unsere Methode gestattet beide Fragen eindeutig zu beantworten, indem in beiden Fällen die Wirkung Schritt für Schritt verglichen werden kann.

Es wurden nun von einer und derselben 22 Tage alten Bouillonkultur ein Teil durch das Berkefeld-Filter vollkommen keimfrei filtriert, der andere durch Zentrifugieren von Bakterien befreit. Von beiden wurde je ein Kubikzentimeter auf je 10 ccm steriler Gelatine (spez. Gew. der Mischung 1,0134) genommen und die innere Reibung bestimmt.

Tabelle I.

Zentrifugat (Viscosimeter A)			Filtrat (Viscosimeter B)	
W.-Z. in Min. <sup>1)</sup>	D.-Z. in Sek. <sup>2)</sup>	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
0	194	3,640	173	3,552
15	100	1,877	91	1,921
30	87	1,633	81	1,710
45	80	1,501	75	1,584
60	78	1,464	72	1,520

Man sieht, daß kaum merkbare Unterschiede in der Wirkung beider Fermentlösungen zu verzeichnen sind. Das Filtrat wirkt tatsächlich etwas schwächer als das Zentrifugat. Es zeigt sich das in etwas weniger rascher Abnahme des Viscositätskoeffizienten. Der Verlauf der  $\eta$ -Abnahme ist aber ein paralleler. Da dieser Versuch mehrfach wiederholt immer mit gleichem Resultat ausfiel, hielt ich mich für berechtigt, die Zentrifugate wenigstens gleichwertig mit den Filtraten anzusehen und ihnen den Vorzug zu geben, da sie stärker wirken, ohne den Reaktionsverlauf schädigend zu beeinflussen.

<sup>1)</sup> W.-Z. = Wirkungszeit.

<sup>2)</sup> D.-Z. = Durchflußzeit.

## 2. Einfluß der Reaktion auf die Wirksamkeit der Prodigiosusgelatinase.

Nach Fermi<sup>1)</sup> ist die gelatinelösende Eigenschaft des Prodigiosusenzym, wie auch anderer Bakterienproteasen, von der Reaktion verhältnismäßig unabhängig. Er sah noch bei Gegenwart von 5<sup>0</sup>/<sub>100</sub> HCl keine Veränderung der Wirkung bezüglich der Gelatinespaltung eintreten, während die fibrinlösende Eigenschaft desselben Ferments nicht mehr zu konstatieren war. Analoge Verhältnisse haben Pollack<sup>2)</sup> beim Trypsin zur Annahme eines besonderen Enzyms — der Glutinasen — geführt.

Als ich nun im Begriffe war, den Einfluß der Reaktion auf die Prodigiosusgelatinase mit Hilfe der Viscositätsmethode nachzuprüfen, publizierte K. Meyer<sup>3)</sup> eine ausführlichere, mit Hilfe der Sørensen-Titrierung ausgeführte Studie über das Reaktionsoptimum für Prodigiosus- und Pyocyaneusprotease. Er fand, daß ihre Wirkung von (H<sup>+</sup>) bzw. (OH<sup>-</sup>) wesentlich beeinflußt wird und daß das Reaktionsoptimum bei 10<sup>-7,146</sup> Wasserstoffionenkonzentration, also bei einer ganz schwach alkalischen Reaktion liegt. Diese Reaktion entspricht wohl auch ungefähr der Alkaleszenz meiner Gelatine und meiner Fermentlösungen. Ich habe mich deswegen bei der Untersuchung des Reaktionseinflusses auf einen Neutralisationsversuch beschränkt, nur um zu sehen, ob und in welcher Weise sich die Säurewirkung bei Anwendung unserer Methode zu erkennen gibt.

Von demselben auf Lackmoid alkalisch reagierendem Bouillonfiltrat wie im Versuche 1 wurden zwei Proben entnommen. Die erste wurde mit steriler Nährbouillon so verdünnt, daß 1 ccm der neuen Lösung 0,5 ccm der Stammlösung entsprach; die zweite wurde zunächst mit HCl vorsichtig versetzt, bis empfindliches rotes Lackmoidpapier nicht mehr deutlich gebläut wurde. Sie wurde dann mit Nährbouillon so weit verdünnt, daß ebenfalls 1 ccm der neutralisierten Lösung 0,5 ccm der Stammlösung gleichkam. Die Gelatine war dieselbe wie bei dem Versuche 1.

Das Resultat der Viscositätsbestimmung bei der Einwirkung beider Fermentlösungen gibt die folgende Tabelle wieder.

---

<sup>1)</sup> Arch. f. Hygiene 10, 1890.

<sup>2)</sup> Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 95. 1905.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. 32, 274, 1911.

Tabelle II.  
(Viscosimeter B.).

Fermentlösung 0,5 cem in nicht neutralisierter Bouillon			0,5 cem derselben Ferment- lösung neutralisiert	
W.-Z. in Min.	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
0	173	3,652	173	3,652
15	112	2,365	125	2,639
30	96	2,027	108	2,280
45	87	1,837	99	2,090
60	82	1,731	92	1,942

Es zeigt sich, daß die Wirkung der Prodigiosusgelatinase in den gegen Lackmoid annähernd neutralen, gegen Lackmus schwachsauren Reaktionen tatsächlich weitergeht, wobei die Viscositätsabnahme während des Versuchs in ähnlicher Weise wie im Kontrollversuch erfolgt. Die weniger rasche Abnahme der  $\eta$ -Werte beweist aber, daß eine nicht unerhebliche Schwächung der Wirkung durch den ziemlich geringen Säurezusatz erfolgt war.

### 3. Einfluß des Fluornatriums auf die Prodigiosusgelatinase.

Die Wahl eines Antisepticums bei der Viscositätsmethode ist nicht leicht. Es soll löslich sein, neutral reagieren und in geringsten Mengen wirksam sein, die innere Reibung nicht beeinflussen, die Fermente nicht angreifen. Solchen Anforderungen entspricht aber kein antiseptisches Mittel gleichzeitig.

Für das Fluornatrium sprachen seine Löslichkeit, sein Charakter als der eines neutralen Salzes, und starke bakterientötende Eigenschaften. Nach Arthus und Huber<sup>1)</sup> ist es für lösliche Fermente unschädlich. Da aber doch die „paralysatorische“ Wirkung des Fluornatriums für viele Fermente bekannt ist, und außerdem auch eine Beeinflussung der Viscosität allein zu vermuten war, so hatte ich mir vorgenommen den Einfluß des Fluornatriums etwas ausführlicher zu untersuchen, einmal auf die Viscosität der Gelatine selbst, dann auf die Fermentwirkung, und zwar: beim direkten Zusatz zu der Gelatinase und beim Zusatz zu der Gelatine.

Bei den folgenden Versuchen wurde ein und dasselbe Bouillonzentrifugat von einer 24 Tage alten Kultur benutzt. Es wurde zum Teil mit 1%igem Fluornatrium versetzt, zum Teil ohne Zusatz gelassen. Als Gelatine dienten 3 verschiedene

<sup>1)</sup> Compt. rend. de l'Acad. de Science 115, 839, 1892.



5%ige Lösungen, von denen eine ohne Fluornatrium bereitet war. Das Resultat ist folgendes.

Tabelle III.

(Viscosimeter A.)

10 ccm 5%iger Gelatine mit 1 ccm Fermentlösung.

Ferment u. Gelatine mit FINa Spez. Gew. 1,0204			Gelatine mit FINa Ferment ohne FINa Spez. Gew. 1,029		Gelatine u. Ferment ohne FINa Spez. Gew. 1,0134	
W.-Z. in Min.	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
0	193	3,647	200	3,782	194	3,641
15	105	1,984	89	1,683	86	1,651
30	93	1,757	80	1,512	79	1,483
45	87	1,644	76	1,437	74	1,39
60	82	1,649	73	1,380	72	1,351

Die innere Reibung wird durch den Zusatz des Fluornatriums, wie zu erwarten war, erhöht. Hierbei fällt es auf, daß die beiden Fluornatriumgelatinelösungen, deren spez. Gewichte nur sehr wenig voneinander verschieden sind (1,0204 und 1,0209) eine erhebliche Abweichung ihrer Anfangsviscositäten aufweisen: 3,647 und 3,782. Offenbar war in beiden Fällen die zugesetzte Fluornatriummenge, die nur grob abgewogen war, verschieden. Auffallenderweise zeigte es sich ferner, daß mit einsetzender Fermentwirkung die Erhöhung der relativen Viscosität durch Fluornatriumzusatz nicht mehr wesentlich zur Geltung kommt, indem die  $\eta$ -Abnahme ganz ähnlich denen ohne Fluornatriumzusatz verläuft.

Die hemmende Wirkung des Fluornatriums auf die Gelatinasewirkung ist ebenfalls aus unserer Tabelle zu ersehen und zeigt interessante Eigentümlichkeiten. Wenn das Fluornatrium der Fermentlösung zugesetzt wurde, so zeigte sich eine erhebliche Schwächung der Gelatinase. Die Wirkung der so geschädigten Gelatinase ist nun zufälligerweise halb so stark wie die der unbehandelten. Als ich nämlich mit Hilfe der in der ersten Reihe angeführten Gelatine eine Verdünnung entsprechend 0,5 desselben Stammferments in 1 ccm, nur ohne Fluornatriumzusatz, untersuchte, bekam ich mit den in der ersten Reihe angeführten vollkommen übereinstimmende Werte.

War aber das Fluornatrium nicht unmittelbar dem Ferment, sondern der Gelatine zugesetzt worden, so war der

schwächende Einfluß ein äußerst geringer. Trotzdem haben mich diese Beobachtungen veranlaßt, auf Antisepticumzusatz meistens zu verzichten, zumal ich mich überzeugen konnte, daß die Versuche nicht unter Abwesenheit eines Antisepticums zu leiden haben, und im Gegenteil günstiger, wie aus der letzten Reihe der Tabelle zu ersehen ist, verliefen.

#### 4. Über die Wirksamkeit der Bakterienextrakte.

Bei der Untersuchung der Extrakte des *M. Prodigiosus* auf ihren Fermentgehalt muß auf einige besondere Umstände Rücksicht genommen werden.

Das Bouillonfiltrat läßt sich mit dem fermenthaltigen Sekret, das von einer Drüse gebildet wird, und das Bakterienextrakt mit dem Extrakt dieser Drüse vergleichen. Aus dieser Ähnlichkeit ergibt sich die Vermutung, daß in den Bakterien selbst, ähnlich wie in Drüsenzellen, nur eine Vorstufe des Enzyms — das Zymogen — enthalten sei, das nicht ohne vorherige Aktivierung zur Wirkung gebracht werden kann.

Es können aber in den Prodigiosusextrakten auch aktivierende Stoffe — Kinasen — neben dem Zymogen vorhanden sein, wie es Delezenne<sup>1)</sup> für viele Bakterien nachgewiesen hatte.

Es ist weiter mit der Möglichkeit zu rechnen, daß, wie dies de Waele<sup>2)</sup> für verschiedene Bakterien zeigte, in der Kulturflüssigkeit Fermente, in den Bakterien selbst aber Antifermente vorhanden sind.

Die von den Massenkulturen gewonnenen Bakterien wurden zunächst in einem Hempelschen Exsiccator unter Phosphorsäureanhydrid im Vakuum binnen 12 bis 18 Stunden zur vollkommenen Trockne gebracht, dann in einer Achatschale zerrieben. Von der gewonnenen Bakterientrockensubstanz wurden 0,1 g mit 10 ccm des betreffenden Lösungsmittels extrahiert. Als solches diente destilliertes Wasser, 0,1%ige und 0,01%ige Sodalösung, 0,01% HCl, 1% FINa und die Nährbouillon. Das Gemisch wurde 24 bis 72 Stunden bei 37° stehen gelassen. Dabei zeigte es sich, daß sogar die Wasserextrakte selbst nach tagelangem Stehen im Brutschrank nicht verdarben und nicht die geringste Spur von Fäulnis aufwiesen, auch wenn

<sup>1)</sup> Compt. rend. de l'Acad. des Sciences T. 135, 1.

<sup>2)</sup> Maly 1908, 833.

sie nicht mehr steril bereitet waren. Leider war ich verhindert, dieser auffallenden Tatsache weiter nachzugehen. Vielleicht steht sie im Zusammenhang mit der Wirkung des von Loew und Kosai<sup>1)</sup> im Prodigosus gefundenen bakteriolytischen Enzyms.

Sollten nun die Extrakte auf ihre Wirksamkeit geprüft werden, so wurden sie durch Zentrifugieren von der Bakterien-substanz befreit. Alle Extrakte waren nach dem Zentrifugieren klar, leicht opalescent, schön rosa gefärbt und reagierten auf Lackmoid stark alkalisch, sogar diejenigen, die mit Salzsäure bereitet waren. Die Alkaleszenz betrug bei Anwendung von Lackmoidpapier für 5 ccm eines in 0,01% HCl bereiteten Extrakts 0,075 ccm, in 0,1%igem Soda 1,1 ccm und im destillierten Wasser 0,95 ccm  $\frac{1}{10}$  n-HCl.

Im Vergleich zu den Bouillonfiltraten waren alle diese Extrakte sehr schwach wirksam. Das Optimum der Wirksamkeit wurde nach 48stündiger Extraktion erreicht, Das Zentrifugieren war ohne Einfluß.

Am wirksamsten war der Sodaextrakt (vgl. Mesernitzky, loc. cit.). Die anderen Extrakte besaßen nur eine äußerst geringe Wirksamkeit, zeigten aber sonst in ihrem Verhalten gar keine Besonderheiten. Alle hatten dieselben Eigenschaften wie die Bouillonzentrifugate bzw. Filtrate. Der Unterschied war nur ein quantitativer. Sie verhielten sich wie sehr verdünnte Bouillonfermentlösungen, indem 1 ccm des wirksamsten Extrakts in der Wirkung etwa der von 0,05 ccm Bouillonzentrifugat entsprach.

Es sei nur das Verhalten des wirksamsten Sodaextrakts kurz tabellarisch angeführt.

Tabelle IV.

(Viscosimeter A.)

10 ccm 5%ige Gelatine und 1 ccm Extrakt (0,1 g Bakt. auf 10 ccm 0,01%ige Soda). Spez. Gew. 1,0209.

W.-Z. in Min.	Ohne Zusatz		Neutralisiert	
	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
0	200	3,782	200	3,782
15	151	2,855	178	3,365
30	135	2,522	162	3,063
45	127	2,401	154	2,911
60	119	2,249	146	2,760

<sup>1)</sup> Zitiert nach Fuhrmann.

Man sieht, wie schwach die Wirkung des Extraktes war. Die Neutralisation schwächt auch das Ferment erheblich stärker, als wie wir es bei Bouillonkulturfermenten beobachtet haben. Es ist leicht begreiflich, daß, da der Sodaextrakt von Hause aus schon viel weniger wirksam ist, er durch alle schädigenden Agentien in höherem Maße angegriffen wird.

Andere Versuche wurden mit den Extrakten von Bakterien angestellt, die durch Alkohol abgetötet und in den trockenen Zustand übergeführt worden waren. Die frischgewonnenen Bakterienrasen wurden zunächst während 4 Tagen unter wiederholtem Abgießen mit Alkohol extrahiert, bis kein Farbstoff mehr vom Alkohol aufgenommen wurde. Dann wurden sie auf Filtrierpapier abgepreßt und im Exsiccator getrocknet. Sie wurden, wie vorhin, mit Soda, Salzsäure und Wasser extrahiert. Hierbei war Zusatz von Chloroform als Antisepticum unentbehrlich, da die Extrakte bald verderben.

Diese Extrakte erwiesen sich als vollkommen unwirksam.

Endlich versuchte ich aus frischen Bakterien ohne Vorbehandlung Extrakte herzustellen. Es wurden 1,30 g, 1,10 g und 1,12 g frisch vom festen Nährboden abgekratzter Bakterienrasen mit 130 bzw. 110 und 130 ccm Sodalösung bzw. HCl und dest. Wasser wie vorhin extrahiert. Auch diese Extrakte verderben ohne Antisepticumzusatz nicht. Die Flüssigkeit war nach dem Zentrifugieren klar, rötlich und reagierte für Lakmoid alkalisch.

Auch alle diese Extrakte erwiesen sich als völlig unwirksam. Dies war für mich sehr auffallend, da Mesernitzky (l. c.) auf dieselbe Weise wirksame Extrakte erhalten konnte. Eine Reihe von Versuchen, diesen Widerspruch wie auch die geringe Wirksamkeit der Bakterienextrakte von den oben angeführten Gesichtspunkten aus aufzuklären, führten nicht zum Ziel.

##### 5. Einfluß der Fermentmenge auf die Spaltung der Gelatine durch die Prodigiosusgelatinase.

Nachdem ich mich durch die bisher beschriebenen Versuche davon überzeugt hatte, unter welchen Bedingungen die stärkste Wirkung der Prodigiosusgelatinase zu erreichen ist, ging ich zu der Untersuchung der Wirkung selbst in ihrer Abhängigkeit von der Fermentmenge, der Menge des zu spaltenden Stoffes (Gelatine) und der Temperatur über.

Ahnliche Untersuchungen sind besonders auch in der letzten Zeit bei anderen Enzymen in großer Zahl ausgeführt worden. Von Versuchen mit Bakterienproteasen liegen meines Wissens in der Richtung nur die interessanten Beobachtungen Fuhrmanns<sup>1)</sup>, die an der Protease des Bakt. panis viscosi gemacht worden sind, vor. Fuhrmann fand eine direkte Proportionalität zwischen der angewandten Fermentmenge und der Menge verflüssigter Gelatine, die aber nur für kleine Fermentmengen festzustellen war. Ferner zeigte sich bei seinen Untersuchungen, daß ebenfalls eine direkte Proportionalität zwischen der Einwirkungszeit und der verflüssigten Gelatinemenge nachzuweisen war. Es erschien deshalb von besonderem Werte, solche Versuche unter Anwendung der Viscositätsmethode auszuführen.

Als Ferment benutzte ich das Bouillonzentrifugat einer 25 Tage alten Kultur. Es war das enzymreichste von allen, die ich im Laufe meiner Experimente gewinnen konnte. Es wurde ohne jeglichen Antisepticumzusatz verwandt. Die Gelatine war ebenfalls ohne Antisepticumzusatz und reagierte für Lakmus schwach alkalisch. Spez. Gewicht der Mischung 1,0134.

Die verschiedenen Fermentmengen wurden durch Verdünnung der Stammlösung mit der Nährbouillon erhalten, und zwar so, daß die gewünschte Menge stets im Volumen von 1 ccm enthalten war. Ich prüfte nacheinander 1 ccm, 0,5 ccm, 0,1 ccm, 0,05 ccm, 0,01 ccm und 0,001 ccm der Stammlösung.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle V.  
(Viscosimeter A.)

		1 ccm		0,5 ccm		0,1 ccm	
W.-Z. in Min.	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$	
0	194	3,640	194	3,640	194	3,640	
15	86	1,651	102	1,910	137	2,571	
30	79	1,482	90	1,689	121	2,270	
45	74	1,389	84	1,576	112	2,101	
60	72	1,351	80	1,501	105	1,970	
		0,05 ccm		0,01 ccm		0,001 ccm	
0	194	3,640	194	3,640	194	3,640	
15	147	2,758	173	3,246	184	3,453	
30	132	2,477	164	3,077	182	3,415	
45	121	2,270	157	2,946	180	3,378	
60	112	2,101	151	2,833	178	3,340	

<sup>1)</sup> Vorlesungen über Bakterienenzyme, S. 46.

Um diese Resultate zu veranschaulichen wurden die für den Viscositätskoeffizient  $\eta$  gefundenen Werte in ihrer Ab-

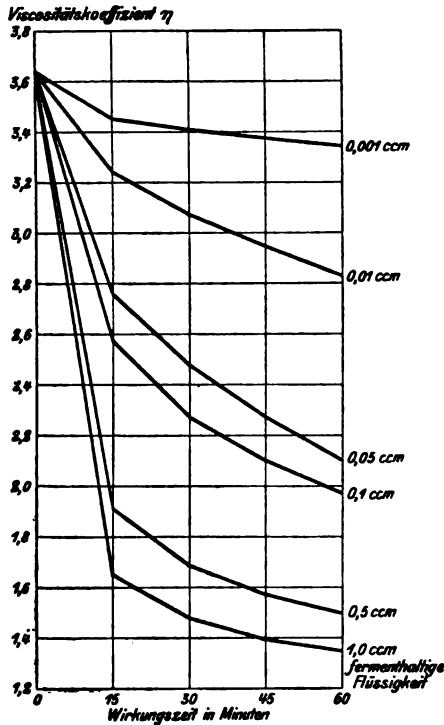


Fig. 1. Abnahme der relativen Viscosität innerhalb einer Stunde bei Einwirkung verschiedener Fermentmengen auf 10 ccm 5%iger Gelatine.

hängigkeit von der Wirkungszeit für alle angewandten Fermentmengen graphisch registriert (s. Fig. 1).

Zunächst sieht man, daß besonders bei größeren Fermentmengen die  $\eta$ -Abnahme am stärksten innerhalb der ersten 15 Minuten erfolgt. In den darauffolgenden Zeitintervallen geht diese Abnahme gleichmäßiger vor sich und der Verlauf der Kurve nähert sich mehr einem geradlinigem.

Vergleicht man nun die verschiedenen Fermentmengen untereinander, so zeigt es sich, daß die Kurven bis zu der Verdünnung von 0,05 auf 1 ccm einschließlich nach 15 Minuten ungefähr parallel verlaufen. Der steile

Abfall der Kurve innerhalb der ersten 15 Minuten kommt aber mit der absteigenden Fermentmenge immer weniger zum Ausdruck, so daß von 0,01 ccm an die Kurve eine deutliche Neigung zur Streckung aufweist. Die  $\eta$ -Abnahme erfolgt also weder der Einwirkungszeit noch der Fermentmenge proportional.

## 6. Einfluß der Gelatinekonzentration auf den Verlauf der Gelatinespaltung durch Prodigiosusgelatinase.

Zum Vergleich mit der Wirkung der Prodigiosusgelatinase auf eine 5%ige Gelatine, wurde auch eine mit dem gleichen

Volumen Wasser verdünnte, also 2,5%ige Gelatinelösung (spez. Gewicht. 1,0105) einer Untersuchung unterworfen.

Als Ferment nahm ich 1 ccm der in der Versuchsreihe V angewendeten Stammlösung, zweitens aber auch 1 ccm einer von einer anderen Kultur stammenden etwas weniger wirksamen Fermentlösung.

Tabelle VI.

W.-Z. in Min.	Viscosimeter B.		Viscosimeter C.	
	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
0	89	1,874	79	1,869
15	63	1,296	50	1,263
30	60	1,263	49	1,238
45	59	1,242	48	1,213
60	58	1,221	47	1,187

Beide Versuche verliefen ganz ähnlich. Auch hier ist die Viscositätsabnahme innerhalb der ersten 15 Minuten am stärksten. Im allgemeinen aber ist die  $\eta$ -Abnahme eine viel gleichmäßigere, so daß ihr Verlauf sich dem durch kleine Fermentmengen bei der 5%igen Gelatine herbeigeführten nähert.

#### 7. Einfluß der Temperatur auf die Prodigosusgelatinase.

Die Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Prodigosusgelatinase geschah auf zweierlei Weise. Einmal sollte die Widerstandsfähigkeit der Prodigosusgelatinase gegen höhere Temperaturen, also ihre Wirkungskraft nach der Vorbehandlung mit Hitze, zweitens sollte der Reaktionsverlauf der Gelatinespaltung in ihrer Abhängigkeit von den während der Reaktion einwirkenden Temperaturen untersucht werden.

##### A. Thermoresistenz der Prodigosusgelatinase.

Die Prodigosusgelatinase ist nach den Beobachtungen Mesernitzkys (l. c.), der darauf von Herrn Geheimrat Pfeiffer aufmerksam gemacht worden war, auffallend wenig empfindlich gegen höhere Temperaturen, durch welche Enzyme für gewöhnlich zerstört werden. Man kann die Prodigosusgelatinase kochen, ohne daß sie unwirksam wird.

Fermi dagegen, der eine ganze Reihe verschiedener Bakterienproteasen auf ihre Widerstandskeit gegen Wärme untersucht hat, gibt für die Prodigosusprotease die Temperatur von

55° als Zerstörungstemperatur an. Worauf dieser Widerspruch zurückzuführen ist, werden wir noch zu erläutern haben.

Die Beobachtungen Mesernitzkys hat nun in der letzten Zeit Kurt Meyer (l. c.) mit Hilfe der Groß-Fuldschen Caseinmethode nachgeprüft und bestätigen können. Dabei fand er aber, daß das Enzym durch Erhitzen auf 56° vollkommen inaktiviert wird, während es durch 15 Minuten langes Kochen fast gar nicht angegriffen wird.

Diese zunächst äußerst interessante Beobachtung Meyers erinnert an den Befund Fermis über die Protease der Käsespirillen und an die Befunde von Delezenne, Mouton und Pozerski,<sup>1)</sup> die an Papain gemacht worden sind.

Die Protease der Käsespirillen wird durch einstündiges Erwärmen auf 55° etwa um ein Drittel ihrer Wirksamkeit geschwächt. Die weitere Erhitzung auf 60° erhöht wieder die Wirksamkeit bis zur Norm, die aber bei 70° endgültig aufgehoben wird. Dies sieht also so aus, als ob in dem betreffenden Enzym ein hemmender Körper enthalten wäre, der bei 55° die volle Wirksamkeit entfaltet, bei 60° aber selbst zerstört wird. Leider ist der umgekehrte Versuch, d. h. das Erhitzen des Fermentes auf 60° und erst nachträglich auf 55° nicht gemacht worden.

Bei Papain ist von den genannten Forschern, was Mendel<sup>2)</sup> bestätigen konnte, beobachtet worden, daß das Enzym bei den um 100° liegenden Temperaturen die stärkste Wirkung auf Serum und Eiereiweißproteine entfaltet.

Ich habe nun an vielen Reihen von Versuchen das Verhalten der Prodigiosusgelatinase nach dem Erwärmen auf verschiedene Temperaturen mit Hilfe der inneren Reibung zu verfolgen gesucht.

Es wurden sowohl Bouillonkulturfermente wie Bakterienextrakte untersucht. Bouillonfiltrate und Bouillonzentrifugate verhielten sich auch hier vollkommen gleich. Das Kochen der Fermente geschah entweder über der freien Flamme bei kurzer Dauer der Erwärmung oder im kochenden Wasserbade. Das Erhitzen auf Temperaturen, die unterhalb 100° liegen, geschah

---

<sup>1)</sup> Compt. rend. de la Soc. de Biol. 9, 309, 1906.

<sup>2)</sup> Journ. of biolog. Chem. 8, Nr. 3, 1910.



während der gewollten Zeit im entsprechend eingestellten Luftbade. Nach dem Erhitzen wurden die Fermente rasch unter der Wasserleitung abgekühlt.

In der meine Resultate umfassenden Tabelle ist der Kochtemperatur die Temperatur von 56° zur Seite gestellt. Die Versuche wurden aber auch bei höheren Temperaturen als 56°, bei 60°, 70° und 80° gemacht, werden aber nicht angeführt, weil sie alle dasselbe Verhalten zeigten.

Zunächst sei der Einfluß der Temperatur auf die Wirksamkeit der Bouillonkulturfermente dargelegt. Zum Vergleich ist gleichzeitig die Wirkung des unbehandelten Ferments angeführt.

Tabelle VII.

Bouillonzentrifugat von 24 Tage alter Kultur, 5%ige Gelatine.  
Spez. Gew. der Mischung 1,029. Anfangs- $\eta$  (W.-Z. = 0) = 3,783.

Ferment frisch (Viscosimeter A).				
W.-Z. in Min.	1 ccm		0,5 ccm	
	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
15	89	1,682	105	1,985
30	80	1,512	93	1,758
45	76	1,437	87	1,644
60	73	1,380	82	1,550

W.-Z. in Min.	1 Min. gekocht (Viscosimeter B 1 ccm)		5 Min. gekocht (Viscosimeter A 1 ccm)		10 Min. gekocht (Viscosimeter A 1 ccm)		30 Min. gekocht (Viscosimeter A 1 ccm)	
	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
15	91	1,935	103	1,947	128	2,419	168	3,176
30	80	1,761	91	1,720	112	2,117	161	3,025
45	75	1,595	85	1,607	103	1,947	155	2,930
60	70	1,489	80	1,512	98	1,853	149	2,817

W.-Z. in Min.	30 Min. auf 56° erhitzt (Viscosim. A 1 ccm)		1 Std. auf 56° erhitzt (Viscosim. A 1 ccm)		2 Std. auf 56° erhitzt (Viscosim. A 1 ccm)	
	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
15	133	2,514	166	3,138	174	3,289
30	121	2,287	158	2,987	170	3,214
45	112	2,117	160	2,836	168	3,176
60	106	1,985	146	2,760	167	3,130

Es zeigte sich, daß die Widerstandsfähigkeit der Prodigiosusgelatinase gegen die Kochtemperatur keine vollkommene ist, was schon Mesernitzky beobachtet hatte. Schon 1 Minute langes Aufkochen über freier Flamme setzt die Wirksamkeit des Ferments so herab, daß die Wirkung von 1 ccm so behandelte Fermentlösung etwa der von 0,5 ccm der ungekochten

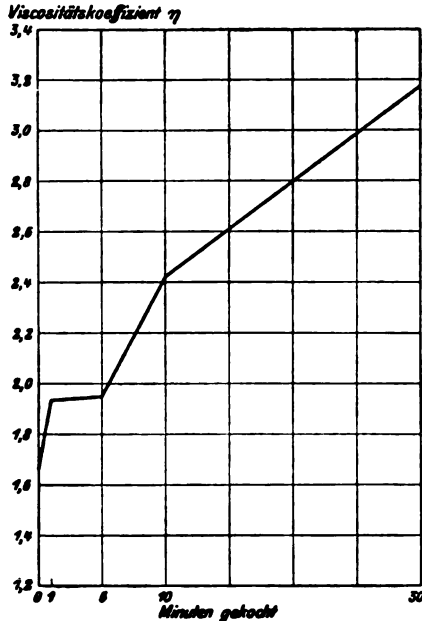


Fig. 2. Abnahme der relativen inneren Reibung während der ersten 15 Minuten, die durch verschieden lang gekochte Fermentlösungen herbeigeführt wurde.

langes Erhitzen kann jedoch noch keine völlige Unwirksamkeit herbeigeführt werden.

Vergleicht man die durch Kochen geschwächten Fermentlösungen mit denen, die durch gleiche Zeit auf 56° erhitzt wurden, so zeigte sich, daß das 30 Minuten lange Kochen die Wirksamkeit stärker als 30 Minuten langes Erhitzen auf 56° herabsetzt. Im allgemeinen aber ist die Schwächung der Prodigiosusgelatinase mehr von der Dauer der Temperaturwirkung, als von der Temperaturhöhe abhängig.

Bei der näheren Betrachtung der Gelatinespaltung, die

gleichkommt. Mit weiter fortgesetztem Kochen nimmt die Wirksamkeit zunächst (bis 5 Minuten) langsam, dann aber immer schneller ab. Das zeigt am besten die Kurve, die ich für die während der ersten 15 Minuten stattfindende Abnahme der inneren Reibung — ausgedrückt durch die Werte für  $\eta$  — bei Untersuchung verschieden lang gekochter Fermentlösungen aufgenommen habe (Fig. 2).

Was die Fermentlösungen anbelangt, welche auf Temperaturen unter 100°, in unserem Falle also auf 56° erhitzt wurden, so werden sie ebenfalls geschädigt; durch 2 Stunden

durch die geschwächten Fermente während der ersten Stunde herbeigeführt wird, findet man, daß die Abnahme der inneren Reibung sich ähnlich wie bei verdünnten Fermentlösungen verhält. So gleicht z. B. die Wirkung, die durch 1 ccm des 1 Minute lang gekochten Ferments herbeigeführt wird, wie schon erwähnt, ungefähr der, die wir mit 0,5 ccm ungekochten Ferments erhalten haben. Ähnlich verhält sich 1 ccm des 30 Minuten lang auf 56° erhitzten Ferments gegenüber 0,1 ccm des frischen (vgl. Tabelle V). Es scheint also, daß es sich bei der Abnahme der Wirksamkeit der durch Hitze geschwächten Fermentlösungen nur um Herabsetzung der Menge wirksamer Substanz handelt. Tatsächlich ist der Grad der Widerstandsfähigkeit der Prodigosusgelatinase gegen höhere Temperaturen von der absoluten Fermentmenge abhängig, indem schwächer wirksame oder durch irgendwelche Agenzien geschädigte Fermentlösungen stärker durch die Hitze angegriffen werden als die wirksamen Fermentlösungen. So wurden die mit Fluornatrium versetzten oder neutralisierten Fermentlösungen schon nach 1 Minute langem Aufkochen ihrer Wirksamkeit völlig beraubt. Aber auch manche nicht vorbehandelte Fermentlösungen, wenn sie nur von Hause aus schwächer wirksam waren, wurden — wenn auch durch etwas längeres Kochen — zerstört. Als Beispiel dafür möchte ich das Bouillonfiltrat und Bouillonzentrifugat von der Tabelle I anführen. Diese Fermentlösungen wurden durch 30 Minuten langes Kochen völlig unwirksam gemacht, während ebenfalls 30 Minuten dauernde Erhitzung auf 56° nur eine sehr starke Schwächung herbeiführte, die aus folgender Tabelle zu ersehen ist.

Tabelle VIII.

1 ccm der auf 56° während 30 Minuten erhitzten Fermentlösung.  
Spez. Gew. der Gelatinemischung 1,0134.

W.-Z. in Min.	Bouillonzentrifugat (Viscosimeter A)		Bouillonfiltrat (Viscosimeter B)	
	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
0	194	3,640	173	3,652
15	184	3,453	162	3,420
30	170	3,190	147	3,103
45	160	3,002	137	2,892
60	151	2,833	130	2,744

Ähnliche Verhältnisse finden wir bei den von Hause aus so schwach wirksamen Bakterienextrakten. In der folgenden Tabelle sind zwei Versuche angeführt, für die mein wirksamstes Sodaextrakt verwandt wurde.

Tabelle IX.

1 cem Sodaextrakt wie Tabelle IV. Spez. Gew. der Gelatinemischungen: 1,0209 und 1,0134.

W.-Z. in Min.	Aufgekocht (Viscosimeter B)		30 Min. auf 56° erhitzt (Viscosimeter C)	
	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
0	178	3,786	144	3,648
15	147	3,126	133	3,369
30	133	2,828	122	3,090
45	124	2,637	114	2,888
60	118	2,509	107	2,710

Hier wirkt das einfache Aufkochen des Ferments beinahe in gleicher Weise schädigend, wie das 30 Minuten lange Erhitzen im Luftbade auf 56°. Die Zerstörung der wirksamen Substanz ist entsprechend der geringen Wirksamkeit der Fermentlösung eine sehr rasche. Untersuchte ich das neutralisierte Extrakt, so fand ich es sofort nach dem Aufkochen vollkommen unwirksam.

Aus dieser Abhängigkeit der Thermoresistenz der Prodigiosusgelatinase von ihrer ursprünglichen Wirksamkeit ergibt es sich auch, warum sie von Fermi u. a. übersehen worden war. Dieser Forscher hat offenbar mit schwächer wirkenden Enzymlösungen gearbeitet und sie einer langandauernden Erhitzung ausgesetzt.

Wie ferner aus meinen Versuchen hervorgeht, konnte ich die Beobachtung Meyers nicht bestätigen. Denn nach meinen Erfahrungen setzt das Kochen, wenn es die gleiche Zeit dauert, die Wirksamkeit der Gelatinase ebenso oder noch stärker herab, wie das Erhitzen auf 56°. Dieser Widerspruch kann vielleicht darauf zurückgeführt werden, daß Meyer die Einwirkung der Prodigiosusprotease auf Casein prüfte, ich aber auf Gelatine, und daß es sich vielleicht um zwei verschiedene Fermente, die sich gegen Temperaturen verschieden verhalten, handeln könnte. Es sei bei dieser Gelegenheit erwähnt, daß auch das von

Gorini<sup>1)</sup> im *Prodigiosus* nachgewiesene „Labenzym“ nach Untersuchungen Hatas<sup>2)</sup> ein von der Gelatinase abweichendes Verhalten gegenüber der Temperatur zeigt, indem es erst durch höhere Temperaturen als 75° angegriffen wird.

#### B. Einfluß der Temperaturerhöhung auf die Gelatinespaltung durch *Prodigiosusgelatinase*.

Um den Reaktionsverlauf bei den verschiedenen Temperaturen mit Hilfe der Viscositätsmethode zu untersuchen, müssen, falls man vergleichbare Werte bekommen will, folgende Forderungen berücksichtigt werden:

1. Die auf ihren Einfluß zu untersuchende Temperatur muß sich nur über die Wirkungszeit des Fermentes erstrecken.

2. Die Viscositätsbestimmung selbst muß unbedingt stets bei einer und derselben Temperatur geschehen, da die Viscosität sehr stark von der Temperatur abhängig ist.

Ich verfuhr folgendermaßen:

Das mit 10 ccm Gelatine und 1 ccm Fermentlösung gefüllte Viscosimeter wurde in ein auf die gewollte Temperatur erwärmtes Wasserbad gestellt und etwa 15 Minuten darin gehalten. Nach Ablauf dieser „Wirkungszeit“ wurde das Viscosimeter aus dem Wasserbade herausgenommen und je nach der Temperatur des Wasserbades rasch mit eiskaltem Wasser abgekühlt, bzw. warmem Wasser erwärmt, um die Viscositätsbestimmung bei der üblichen Temperatur (32° C.) machen zu können. Darauf wurde wiederum das Viscosimeter auf die zu prüfende Temperatur gebracht und gelangte nochmals auf 15 Minuten in das betreffende Wasserbad usf.

Die Beschaffenheit des Viscosimeters selbst veränderte sich bei diesem raschen und häufigen Temperaturwechsel in keiner nennenswerten Weise. Trotzdem schien mir eine vielfache Wiederholung der Versuche unerlässlich, um sie auf ihre Zuverlässigkeit zu prüfen. Als Beispiel für eine ziemlich weitgehende Übereinstimmung der Resultate führe ich alsbald zwei völlig gleichartige Versuchsreihen an.

Zunächst sollten die Temperaturen, die innerhalb der Grenzen für die Erstarrung der Gelatine einerseits, und für die

<sup>1)</sup> Zit. nach Fuhrmann.

<sup>2)</sup> Centralbl. f. Bakt. 1, 34, 1904.

scheinbar beginnende Schwächung der Fermentwirksamkeit andererseits, d. h. zwischen 20° und 50° liegen, untersucht werden.

Die Temperaturen sollten ferner in Abständen von 10° liegen. Dementsprechend wurde der Reaktionsverlauf bei 22°, 32° und 42° verglichen.

In den folgenden Tabellen sind 2 Versuchsreihen wiedergegeben, wobei die Fermentlösungen verschieden waren.

Tabelle X a.

Bouillonzentrifugat einer 21 Tage alten Kultur. Spez. Gew. der Mischung 1,0134. Viscosimeter A.

W.-Z. in Min.	22°		32°		42°	
	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
0	194	3,640	194	3,640	194	3,640
15	115	2,158	100	1,877	91	1,708
30	94	1,769	87	1,633	81	1,520
45	88	1,651	80	1,501	75	1,407
60	83	1,558	78	1,464	74	1,388

Tabelle X b.

Bouillonzentrifugat einer 23 Tage alten Kultur. Dieselbe Gelatine wie vorhin, Viscosimeter C.

W.-Z. in Min.	22°		32°		42°	
	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
0	144	3,648	144	3,648	144	3,648
15	81	2,852	72	1,824	67	1,697
30	71	1,799	63	1,596	60	1,548
45	65	1,647	59	1,495	56	1,419
60	63	1,596	58	1,469	54	1,368

Man sieht aus diesen beiden Tabellen, daß der Reibungskoeffizient  $\eta$  mit Steigerung der Reaktionstemperatur immer schneller abnimmt, daß also die Reaktionsgeschwindigkeit der Gelatinespaltung durch Prodigiosusgelatinase zunimmt.

Ich untersuchte nun weiter auch den Reaktionsverlauf bei 52°, 62° und 100°. In der folgenden Tabelle stelle ich die bei diesen Temperaturen erhaltenen  $\eta$ -Werte neben die für 42° erhaltenen zum Vergleiche dar.

Tabelle XI.

Dieselben Bedingungen wie bei der Tabelle Xb.

W.-Z. in Min.	42°		52°		62°		100°	
	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$	D.-Z. in Sek.	$\eta$
0	144	3,648	144	3,648	144	3,648	144	3,648
15	67	1,697	66	1,672	91	2,305	98	2,483
30	60	1,548	60	1,548	75	1,900	86	2,179
45	56	1,419	57	1,444	72	1,824	81	2,052
60	54	1,368	55	1,393	69	1,748	77	1,950

Im Vergleich mit dem Reaktionsverlauf bei 42° nimmt bei 52° die Wirkung am Anfang der Reaktion noch ganz wenig zu, im weiteren Verlauf aber wird sie allmählich schwächer; und während nach den ersten 15 Minuten das Ferment eine Kleinigkeit stärker wirkt als bei 42° und nach 30 Minuten dieselbe Wirkung entfaltet, so erscheint dieselbe nach 45 und 60 Minuten wesentlich schwächer. Hier kämpfen miteinander die reaktionsbeschleunigende und die fermentschwächende Wirkung der Temperatur.

Bei 62° ist die Verlangsamung der  $\eta$ -Abnahme eine schon ganz erhebliche. Bei 100° ist die Wirkung des Ferments noch geringer, aber noch eine ganz deutliche. Diese letzte Beobachtung könnte als nicht ganz einwandfrei bezeichnet werden, insofern als die Gelatine selbst durch die Kochhitze allein verändert wird. Diese Veränderung wird aber nach meiner Erfahrung erst nach viel längerem Kochen so stark, daß sie einen mit unseren Werten vergleichbaren Einfluß auf die  $\eta$ -Werte erkennen läßt, wobei die durch das Kochen der reinen Gelatine herbeigeführte Viscositätsabnahme eine sehr schwankende ist. Jedenfalls besteht die Tatsache, daß die Prodigosusgelatinase noch auf die Gelatine bei den Temperaturen bis 100° einschließlich einzuwirken vermag. Das Interessante dabei ist das, daß diese Wirkung viel stärker ist als die, die man erhält, wenn man die fermenthaltige Lösung allein, vor dem Vermischen mit der Gelatine, die gleiche Zeit der betreffenden Temperatur aussetzt. Man braucht nur die Tabelle XI mit der Tabelle VII zu vergleichen. Die relative innere Reibung nimmt bei der Einwirkung einer auf 56° eine Stunde lang erhitzten Enzymlösung von 3,783 auf 2,760, während einer Stunde ab. War das Ferment mit Gelatine vermischt und darauf der Temperatur

von 62° ausgesetzt, so sank die Abnahme von  $\eta$  bei derselben Wirkungszeit von 2,640 auf 1,748.

Es scheint somit, als ob die Gelatine, ähnlich wie wir das für den schädigenden Einfluß von Fluornatrium beobachtet hatten, das Ferment auch vor der Hitzeeinwirkung schützte.

Beide Erscheinungen ließen sich erklären durch die Annahme, daß die Gelatinase, wie gewisse andere Enzyme, den Charakter eines amphoteren Elektrolyten hat. Die positiv bzw. negativ elektrische Gruppe kann sich an die entgegengesetzt geladenen Atomgruppen der Gelatine anlagern. Es wäre also die Verbindung des Enzyms mit dem Substrat gegen Hitze weniger empfindlich als die wässrige Lösung. Der Unterschied einer wässrigen und gelatinehaltigen Fermentlösung bei Zusatz von Fluornatrium wäre dadurch bedingt, daß sich bei Zusatz von Fluornatrium zur wässrigen Fermentlösung eine unwirksame Komplexverbindung zwischen Fluornatrium und Ferment bildet. Bei Zusatz von Fluornatrium zur Gelatinelösung entsteht eine Verbindung der Gelatine mit Fluornatrium, aus welcher auch bei Einwirkung des Enzyms die Fluor- und Natrium-Ionen nicht frei werden.

#### 8. Versuch einer theoretischen Formulierung der gewonnenen Resultate und weitere Schlußfolgerungen.

Die übersichtliche Darstellung der bisher mitgeteilten Versuche in Gestalt der in ein Koordinatensystem eingetragenen Kurven ließ eine gewisse Gesetzmäßigkeit erkennen, welche zu der Frage anregte, ob sich nicht für jene Gesetzmäßigkeit ein einfacher mathematischer Ausdruck finden ließe.

Ich verdanke der Liebenswürdigkeit des Herrn Priv.-Doz. Dr. Sackur, dem ich auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte, folgende Überlegung:

„Es sei  $X$  die Menge der unzersetzten Gelatine, die zur Zeit  $t$  vorhanden ist. Unter der Voraussetzung, daß die innere Reibung nur durch den Gehalt an Gelatine bestimmt wird, ist nach Arrhenius<sup>1)</sup>:

$$\eta = A^x,$$

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physikal. Chem. 1, 285, 1887.



worin  $A$  eine von der Natur des gelösten Stoffes abhängige Konstante bedeutet. Oder:

$$\lg \eta = x \lg A, \text{ oder } x = \frac{\lg \eta}{\lg A} . . . . . (1)$$

Wäre die Hydrolyse der Gelatine eine monomolekulare Reaktion, so gilt nach dem Massenwirkungsgesetz die Gleichung:

$$\frac{dx}{dt} = -kx, \text{ oder integriert:}$$

$$\lg a - \lg x = kt . . . . . (2),$$

wenn  $a$  die Anfangskonzentration der Gelatine (zur Zeit 0) bedeutet. Daraus folgt unter Berücksichtigung von (1)

$$\lg a - \lg (\lg \eta) + \lg (\lg A) = kt . . . . . (3)$$

$\lg a$  und  $\lg (\lg A)$  sind konstant, also muß  $\lg (\lg \eta)$  eine lineare Funktion von  $t$  sein.“

Die Voraussetzung, daß die innere Reibung im wesentlichen durch den Gehalt an Gelatine bedingt ist, gilt aber nur so lange, als die Menge der durch das Ferment entstandenen Umwandlungsprodukte im Verhältnis zur nichtgespaltenen Gelatine klein ist, oder die innere Reibung dieser Umwandlungsprodukte vernachlässigt werden kann.

Auch die zweite Voraussetzung, daß die Spaltung der Gelatine durch die Gelatinase als monomolekulare Reaktion zu behandeln ist, ist nur innerhalb gewisser Grenzen zutreffend. Daß der stufenweise Abbau eines hochmolekularen Körpers durch Hydrolyse in einfache Spaltungsprodukte nach den Gesetzen einer monomolekularen Reaktion verlaufen kann, ergibt sich aus den Überlegungen und Beobachtungen, die Julius Meyer<sup>1)</sup> bei Untersuchungen über die Verseifung der Glycerinester machte. Sie gelten aber nicht ohne weiteres für enzymatische Vorgänge, da bei diesen das Enzym durch die Spaltungsprodukte inaktiviert werden kann und überdies Fälle bekannt sind, in denen neben einer enzymatischen Spaltung des hochmolekularen Körpers auch eine enzymatische Synthese der aus ihm entstandenen Spaltungsprodukte erfolgte.

---

<sup>1)</sup> L. Ubbelohde und F. Goldschmidt, Handb. d. Chemie u. Technologie der Fette u. Ole. Leipzig 1911, Bd. III, S. 387.

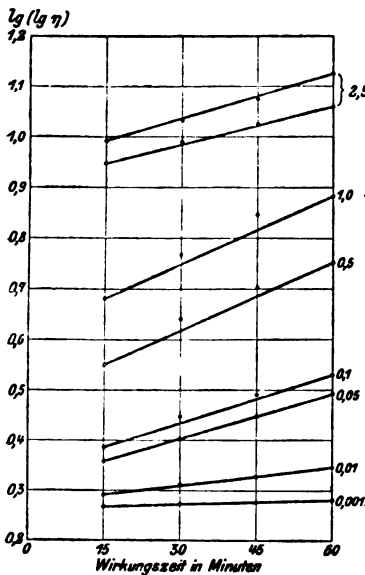
Konnte man hiernach auch nicht erwarten, daß jene einfache, durch obige Gleichung ausgedrückte Beziehung zwischen dem Verhalten der inneren Reibung und der Wirkung der Gelatinase besteht, so schien es doch nicht ohne Wert, die für die Wirkung der Prodigiosusgelatinase gefundenen Zahlen unter dem Gesichtspunkte obiger Gleichung zu betrachten.

Wir haben deshalb für alle in der Tabelle V angeführten Reaktionen den  $\lg(\lg \eta)$  ausgerechnet und in der Abhängigkeit von der Wirkungszeit graphisch registriert (s. Fig. 3). Die  $\lg(\lg \eta)$ -Werte sind in Tabelle XII zusammengestellt.

Tabelle XII. (Vgl. Tabelle V.)

W.-Z. Min.	1 cem $\lg(\lg \eta)$	0,5 cem $\lg(\lg \eta)$	0,1 cem $\lg(\lg \eta)$	0,05 cem $\lg(\lg \eta)$	0,01 cem $\lg(\lg \eta)$	0,001 cem $\lg(\lg \eta)$
15	-0,682	-0,551	-0,387	-0,356	-0,292	-0,269
30	-0,787	-0,642	-0,449	-0,404	-0,312	-0,273
45	-0,847	-0,703	-0,492	-0,449	-0,329	-0,276
60	-0,884	-0,753	-0,532	-0,491	-0,345	-0,281

Es zeigte sich nun, daß die obige Gleichung für kleinere Fermentmengen, von 0,1 cem Fermentlösung angefangen, ziemlich



gut stimmt, während die größeren Fermentmengen eine wesentliche Abweichung zeigen. Die Kurve der Werte für  $\lg(\lg \eta)$  entfernt sich um so mehr von einer Geraden, je größer die Fermentmengen sind. Die obengemachten Voraussetzungen scheinen also nur bei kleinen Fermentmengen zuzutreffen.

Dasselbe scheint auch für schwächere Gelatinekonzentration zu gelten. Die Werte für  $\lg(\lg \eta)$ , die aus den in der Tabelle VI für 2,5%ige Gelatine angeführten  $\eta$ -Werten aus-

Fig. 3. Die Punkte bedeuten die Werte für  $\lg(\lg \eta)$  und zeigen ihre Beziehung zum geradlinigen Verlauf.

gerechnet wurden, stellten, wie aus der folgenden Tabelle und der Fig. 3 zu entnehmen ist, bis auf geringe Abweichungen, die innerhalb der Versuchsgrenzen liegen, ebenfalls eine geradlinige Funktion von  $t$  dar.

Tabelle XIII. (Vgl. Tabelle VI.)

W.-Z. Min.	$\lg(\lg \eta)$	$\lg(\lg \eta)$
15	-0,948	-0,993
30	-0,993	-1,033
45	-1,026	-1,077
60	-1,061	-1,127

Desgleichen fand es sich, daß die durch Kochen bzw. Erhitzen geschwächten Fermente wiederum eine ziemlich genaue Übereinstimmung mit der für kleine Mengen des Ferments angeführten Gesetzmäßigkeit zeigen. In der folgenden Tabelle gebe ich die der Tabelle VII entsprechenden für  $\lg(\lg \eta)$  ausgerechneten Werte, die auf der Fig. 4 graphisch dargestellt sind, wo zum Vergleich auch das Verhalten unbehandelten Ferments herangezogen ist.

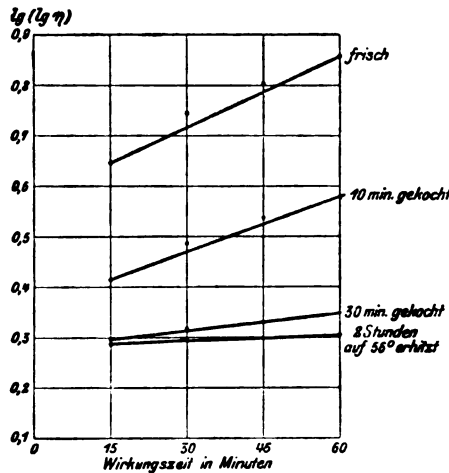


Fig. 4. Linearer Verlauf von  $\lg(\lg \eta)$  für die durch die Hitze geschwächten Fermente.

Tabelle XIV. (Vgl. Tabelle VII.)

W.-Z. Min.	Frisch $\lg(\lg \eta)$	10 Min. gekocht $\lg(\lg \eta)$	30 Min. gekocht $\lg(\lg \eta)$	2 Stunden auf 56° erhitzt $\lg(\lg \eta)$
15	-0,646	-0,415	-0,299	-0,286
30	-0,745	-0,487	-0,318	-0,294
45	-0,802	-0,538	-0,330	-0,299
60	-0,859	-0,577	-0,347	-0,303

Man sieht also, daß je mehr das Ferment durch die Hitze geschwächt war, desto mehr nähert sich die Funktion  $\lg(\lg \eta)$

einer linearen. Bei 2 Stunden lang erhitzten oder 30 Minuten lang gekochten Fermentlösungen ist sie es auch fast genau.

Das wäre ein weiterer Beweis für die Anschauung, daß es sich bei der Herabsetzung der Fermentwirkung durch Wärme nicht um eine Veränderung der Eigenschaften des Ferments, sondern um eine Verminderung der Fermentmenge handelt.

Unter den oben gemachten Voraussetzungen lassen sich für die verschiedenen Versuchsreihen auch die Reaktionskonstanten berechnen. Es gilt hier die Formel:

$$k = \frac{\lg(\lg \eta_1) - \lg(\lg \eta_2)}{t_1 - t_2}$$

$\eta_1$  und  $\eta_2$  sind die Werte der relativen inneren Reibung, die bei den Temperaturen  $t_1$  und  $t_2$  gefunden wurden.

Um zunächst den Einfluß der Fermentmenge auf die Reaktionsgeschwindigkeit zu prüfen, habe ich für alle in der Tabelle V angeführten Reaktionen die Reaktionskonstante ausgerechnet, wobei ich mich auf die Bestimmung der Reaktionskonstanten für 45 Minuten (also  $t_1 = 15$ ,  $t_2 = 60$  Minuten) beschränkt habe. Es zeigte sich folgendes:

Tabelle XV.

	$k$		$k$
1 ccm Ferment .	0,0045	0,05 ccm Ferment	0,0030
0,5 " " .	0,0045	0,01 " "	0,0012
0,1 " " .	0,0032	0,001 " "	0,00027

Die Konstante  $k$  ist bei der Fermentmenge, die in einem und einem halben Kubikzentimeter der Bouillon enthalten war, die gleiche. Bei weiterer Verdünnung nimmt sie zunächst nur langsam, dann aber viel schneller ab, jedoch nicht proportional der Fermentmenge.

Wir wollen nun aus dieser einen Versuchsreihe keine Gesetzmäßigkeit herleiten, sie scheint uns aber doch darauf hinzuweisen, daß die Konstante  $k$  unter den obigen Versuchsbedingungen bestimmt einen einfachen Ausdruck für die Spaltung der Gelatine durch die Prodigiosusgelatinase gewährt und voraussichtlich in einfacher Weise auch die Wirkung verschiedener Gelatinasen miteinander zu vergleichen gestattet.

Durch Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit läßt sich auch der Einfluß, den die Temperatur auf die Enzymreaktion ausübt, genauer verfolgen. Dies war interessant vor allem bezüglich der von van t'Hoff<sup>1)</sup> gefundenen, von Kanitz<sup>2)</sup> kurz als RGT-Regel bezeichneten Gesetzmäßigkeit.

<sup>1)</sup> Vorles. über theoret. u. physik. Chemie 1898.

<sup>2)</sup> Biolog Centralblatt 26, 1907.

Nach dieser empirischen Regel wird bekanntlich durch eine Temperaturerhöhung von 10° die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt bis verdreifacht. Kanitz und andere Forscher wiesen die Gültigkeit dieser Regel auch für gewisse biologische Vorgänge nach.

Aus den in den Tabellen Xa und Xb angegebenen Daten wurde nun die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die ersten 15 Minuten ( $t_0 = 0$ ,  $t_1 = 15$ ) und für die ganze Stunde ( $t_0 = 0$ ,  $t_1 = 60$ ) der Fermentwirkung ausgerechnet. Ich erhielt folgende Zahlen.

Tabelle XVIa.

	22°	32°	42°	
$k$	0,015	0,020	0,025	für die ersten 15 Minuten
$k$	0,0077	0,0088	0,0099	für d. Verlauf einer Stunde

Tabelle XVIIb.

$k$	0,017	0,022	0,027	für die ersten 15 Minuten
$k$	0,0073	0,0088	0,0102	für d. Verlauf einer Stunde

In beiden Fällen zeigte sich, daß die Reaktionskonstante  $k$  in ganz bestimmter Weise linear steigt, wenn die Temperatur um 10° erhöht wird. Es ist geradezu auffallend, wie die durch beide Versuchsreihen gelieferten Werte übereinstimmen, anscheinend ein Beweis für die Genauigkeit der Methode.

Der Quotient  $\frac{K_{t_0+10}}{K_{t_0}} = K_{10}$  für den Zuwachs der Reaktionsgeschwindigkeit während der ersten 15 Minuten ist etwa 1,3, nach Ablauf einer Stunde etwa 1,15. In unserem Falle folgte also die Reaktionsgeschwindigkeitszunahme der RGT-Regel nicht. Indessen ist es aber bekannt (A. Slator)<sup>1)</sup>, daß auch der Temperaturquotient photochemischer und gewisser katalytischer Reaktionen ebenfalls kleiner gefunden wird, ähnlich so wie es für sehr hohe Temperaturen zutrifft.

Für Enzymreaktionen kann vielleicht die Erklärung dafür in der von Duclaux<sup>2)</sup> als Begründung des Temperaturoptimums der Fermentreaktion betonten Zersetzbarkeit der Fermente gesucht werden, deren Geschwindigkeit schon bei niedrigeren Temperaturen einen meßbaren Betrag aufweist. Steigert man daher die Reaktionstemperatur, so steigt zwar die Reaktionsgeschwindigkeit des fermentativen Vorganges, gleichzeitig damit vermindert sich jedoch die wirksame Fermentmenge, weshalb das Steigen der Reaktionsgeschwindigkeit gewissermaßen von zwei entgegengesetzt wirkenden Faktoren abhängig ist. Eine andere Ursache könnte auch die sein, daß die Diffusionsgeschwindigkeit, die bei der Einwirkung des Enzyms auf die Gelatine eine Rolle spielt, von der Temperatur weniger beeinflußt wird als die Reaktionsgeschwindigkeit.

<sup>1)</sup> Zit. nach Kanitz, l. c.

<sup>2)</sup> Traité de Microbiologie 2, 193, 1899.

Endlich kommen auch enzymatische synthetische Vorgänge in Betracht, die der Spaltung entgegenwirken.

Fasse ich zum Schluß die Ergebnisse meiner Versuche zusammen, so zeigte sich folgendes:

1. Die wirksamsten Lösungen der Prodigiosusgelatinase werden aus den Bouillonkulturen gewonnen, die durch Zentrifugieren von den Bakterien zu befreien sind.

2. Die Prodigiosusgelatinase ist gegen Säure- und Fluornatriumzusatz sehr empfindlich.

3. Die Widerstandsfähigkeit der Prodigiosusgelatinase gegen hohe Temperaturen ist eine sehr große, aber nicht vollkommene.

4. Die Gelatine schützt das Enzym vor dem schädigenden Einfluß des Fluornatriums und der Temperaturerhöhung.

5. Die Reaktionsgeschwindigkeit scheint bei nicht zu kleineren Fermentmengen und Anwendung 5%iger Gelatine eine konstante zu sein.

6. Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur um  $10^{\circ}$  nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der Prodigiosusgelatinasewirkung weniger zu, als nach der RGT-Regel verlangt wird.

7. Die Bestimmung der inneren Reibung ist eine für die Untersuchung von Gelatinasen sehr brauchbare Methode.

---

# Über Kalkresorption und Verkalkung.

Von

Masahiko Tanaka (Nagasaki).

(Aus dem pathologischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 7. Dezember 1911.)

Zur Vervollständigung meiner Arbeit über Kalkresorption und Verkalkung im 1. bis 2. Heft des 35. Bd. dieser Zeitschrift möchte ich mir gestatten, nunmehr im folgenden über die mikroskopische Untersuchung des Materials meiner damals mitgeteilten Experimente und einiger weiterer inzwischen dazugekommener Experimente kurz zu berichten. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden unter Leitung des Herrn Prof. Chiari ausgeführt.

Das Material d. h. die entsprechenden Gewebstücke wurden in Alkohol gehärtet, in Celloidin eingebettet und die Färbung der Schnitte teils mit Hämatoxylin-Eosin, teils nach der Methode von van Gieson vorgenommen. Nach Bedarf wurden an den Schnitten auch mikrochemische Reaktionen ausgeführt. Die mikroskopische Untersuchung erstreckte sich gewöhnlich auf die verschiedensten Organe der Versuchstiere. In dem Berichte sind aber in der Regel nur die positiven Befunde berücksichtigt.

## Versuche über die Resorption von Calciumphosphat im lebenden Gewebe.

Darauf bezogen sich die Experimente 10, 11, 12, 13, 14. Das  $\text{CaHPO}_4$  wurde, suspendiert in 0,9%  $\text{ClNa}$ -Lösung, in die Gewebe von Kaninchen injiziert.

Im Experiment 10 — Injektion von 0,2 g in die Leber, Tod nach 35 d., makroskopisch Narbe in der Leber und kleine weiße Flecken am Magen und der unteren Zwerchfellfläche — fand sich mikroskopisch

im Bereiche der weißen Flecken Verkalkung des subperitonealen Bindegewebes mit Riesenzellen von dem Charakter der Fremdkörperriesenzellen in der Umgebung. Die Leber war frei von Verkalkung.

Im Experiment 11 — Injektion von 0,1 in die l. Niere, Tod nach 6 d., makr. Narbe in der l. Niere — fanden sich mikr. in dieser Narbe keine Kalkablagerungen, wohl aber kleinste Verkalkungen in der Mucosa des Beckens dieser Niere mit geringer Entzündung in der Umgebung; weiter war das Epithel einzelner Tubuli recti derselben Niere stellenweise verkalkt.

Im Experiment 12 — Injektion von 0,05 g in die Milz, Tod nach 18 d., makr. negativ — fand sich auch mikr. nirgends Verkalkung.

Im Experiment 13 — Injektion von 1,0 g in die Subcutis der Bauchwand, Tod nach 10 d., makr. weiße Masse an der Injektionsstelle — zeigte sich mikr. neugebildetes Bindegewebe um die Reste der Injektionsmasse und stellenweise Verkalkung im subperitonealen Bindegewebe des Magens.

Im Experiment 14 — Injektion von 0,5 g in die Rückenmuskulatur r. und ebensoviel am nächsten Tage l., Tod 12 d. nach der l. Injektion, makr. sehr spärliche weiße Massen an den Injektionsstellen — zeigte sich mikr. nur um die Reste der Injektionsmasse geringe Entzündung.

In den Experimenten 13 und 14 fanden sich in der Magenschleimhaut viele Ecchymosen, in deren Bereiche die Schleimhaut mikroskopisch das Bild peptischer Erosionen bot.

#### Versuche über die Ablagerung von Kalksalzen im Tierkörper.

Die hierher gehörenden Experimente möchte ich für die Mitteilung der Resultate der mikroskopischen Untersuchung so anordnen, daß ich zuerst über die Experimente mit gelösten Salzen:  $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2$  und  $\text{Mg}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$  und dann über die Experimente mit suspendierten Salzen:  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  und  $\text{SrCO}_3$  berichte.

#### Injektion von $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$ in die Bauchhöhle.

$\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$  wurde in 7 Experimenten — 23, 24, 40, 41, XLI, LXXV und LXXVI<sup>1)</sup> in die Bauchhöhle von Kaninchen, 1 mal — 33 in die Bauchhöhle eines Hundes und 1 mal — 35 in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens injiziert.

Im Experiment 23 — Injektion von 6,0 g, Tod 14 d. nach der ersten Injektion, makr. reichliche weiße Streifen und Flecken im Peri-

<sup>1)</sup> Diese und alle folgenden mit lateinischen Nummern bezeichneten Experimente wurden nach Abschluß meiner früheren Arbeit ausgeführt.



toneum — entsprachen mikr. diesen Streifen und Flecken ausgebreitete Verkalkungen des Subperitoneums. Ferner fand sich Verkalkung einzelner Muskelfasern und kleiner Muskelfasergruppen in mehreren Extremitätenmuskeln und im Herzen, stellenweise umschriebene, nur mikr. zu erkennende fleckige Verkalkung der Intima und Media der Aorta und Bildung von Kalkzylindern in einzelnen geraden Nierenkanälchen.

Im Experiment 24 — Injektion von 0,75 g, Tod nach 2 d., makr. spärliche weiße Streifen am Peritoneum — fand sich mikr. in den Streifen Verkalkung des Subperitoneums und weiter Verkalkung einzelner Muskelfasern des Zwerchfells, des Magens und Darms. Um die verkalkten Muskelfasern bestand leichte Entzündung.

Im Experiment 40 — Injektion von 3,75 g, Tod 19 d. nach der 1. Injektion, makr. sehr reichliche weiße Streifen am Peritoneum — zeigte sich mikr. in den weißen Streifen Verkalkung des Subperitoneums mit stellenweiser Entzündung. Weiter waren einzelne Muskelfasern der Bauchmuskulatur, der Muskulatur des Magens und Darms und der Harnblase, sowie einzelne Blutgefäße des großen Netzes stellenweise verkalkt.

Im Experiment 41 — Injektion von 7,0 g, Tod 41 d. nach der 1. Injektion, makr. reichliche weiße Streifen am Peritoneum — bot sich mikr. dasselbe Bild wie in dem früheren Falle, nur daß um die Verkalkungsherde im Subperitoneum außer kleinzelliger Infiltration auch Riesenzellen zu sehen waren und daß die Harnblase von Verkalkung frei war.

Im Experiment LXI — Injektion von 4,5 g, Tod 7 d. nach der 1. Injektion, makr. reichliche weiße Streifen am Peritoneum und in den Muskeln des Thorax und der hinteren Extremitäten — zeigten sich mikroskopisch zahlreiche Verkalkungsherde im Subperitoneum mit Entzündung, ferner bestand Verkalkung einzelner größerer Fasergruppen der Muskeln des Thorax, der hinteren Extremitäten und des Zwerchfells und einzelner kleiner Muskelfasergruppen im Darm und der Wand etlicher Arterien und Venen des Mesenteriums und Omentum majus sowie stellenweise Epithelverkalkung in einzelnen gewundenen Harnkanälchen.

Im Experiment LXXV — Injektion von 1,5 g, Tod nach 15 d., makr. mäßig viele weiße Streifen am Peritoneum — fanden sich mikr. im Subperitoneum im Bereiche der weißen Streifen Verkalkungsherde mit kleinzelliger Infiltration und Riesenzellen in der Umgebung. Sonst bestand noch stellenweise Epithelverkalkung einzelner gerader Nierenkanälchen.

Im Experiment LXXVI — Injektion von 2,25 g, Tod nach 4 d., makr. zahlreiche weiße Streifen am Peritoneum — fanden sich mikr. nur reichliche Verkalkungsherde im Subperitoneum mit kleinzelliger Infiltration und Riesenzellen in der Umgebung.

Im Experiment 33 — Injektion von 9,0 g, Tod 27 d. nach der 1. Injektion, makr. mäßig viele weiße Streifen am Peritoneum — zeigte sich mikr. um die Verkalkungsherde im Subperitoneum Riesenzellenbildung und bestand außerdem stellenweise Verkalkung des Epithels einzelner gerader Nierenkanälchen.

Im Experiment 35<sup>1)</sup> — Injektion von 1,37 g, Tod 30 d. nach der 1. Injektion, makr. sehr viele weiße Streifen am Peritoneum — zeigten sich mikr. viele Verkalkungsherde im Subperitoneum mit kleinzelliger Infiltration in der Umgebung. Ferner fanden sich einzelne Muskelfasern in der Bauchmuskulatur, im Magen und im Darms, sowie einzelne oberflächlich gelagerte Leberzellen verkalkt.

Diesen 9 Experimenten reihte ich das Experiment 28 an — Injektion von 2,0 g  $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$  in die r. Pleurahöhle eines Kaninchens, Tod 26 d. nach der 1. Injektion, makr. reichliche weiße Streifen an der r. Pleura. — Mikroskopisch fanden sich reichliche Verkalkungsherde im subpleuralen Bindegewebe r. mit kleinzelliger Infiltration und Riesenzellenbildung in der Umgebung, ferner stellenweise Verkalkung von größeren Gruppen von Muskelfasern in der r. Zwerchfellhälfte und der Muskeln der r. Thoraxhälfte in der Gegend der Injektionsstellen.

In den Fällen 23, 24 und 28 waren außerdem Magenblutungen zugegen, in Form kleiner Ecchymosen, teils ganz frischen, teils älteren Datums, im Falle 35 viele kleine Blutungen in den Bauchdecken. Die Magenblutungen boten mikr. denselben Befund, wie er von den Fällen 13 und 14 erwähnt wurde.

#### Injektion von $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$ in die Blutbahn.

$\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$  wurde 6 mal in die V. femoralis von Hunden — Experimente 42, 43, 44, 45, III und IV injiziert und 2 mal in die Ohrvene von Kaninchen — Experimente V und XLVII.

Im Experiment 42 — Injektion von 3,4 g, Tod nach 15 Stunden, makr. Knirschen der Nieren beim Einschneiden — fand sich stellenweise mikr. Verkalkung des Epithels in einzelnen gewundenen und geraden Nierenkanälchen, sowie auch in einigen Sammelröhren und weiter Verkalkung einzelner Muskelfasern des Herzens.

Im Experiment 43 — Injektion von 3,0 g, Tod nach 10 d., makr. einzelne weiße Flecken an der Leber und Milz — ergab sich mikr. umschriebene stellenweise Verkalkung in der Leber- und Milzkapsel, in der Submucosa und Subserosa des Magens, ziemlich starke Verkalkung des Epithels einzelner gewundener und gerader Harnkanälchen und einzelner Sammelkanälchen und Verkalkung einzelner Muskelfasern und kleiner Gruppen solcher im Herzen.

Im Experiment 44 — Injektion von 4,6 g, Tod nach 15 Stunden, makr. negativ — fand sich mikr. stellenweise Verkalkung der Leberkapsel, stellenweise Verkalkung des Epithels einzelner Harnkanälchen und einzelner Fasern und Fasergruppen der Herzmuskulatur.

<sup>1)</sup> In meiner früheren Arbeit ist von diesem Falle irrtümlich angegeben, daß auch in die Muskulatur der hinteren Extremitäten injiziert worden war.

Im Experiment 45 — Injektion von 4,6 g, Tod nach 15 Stunden, makr. Knirschen der Nieren beim Einschneiden — fand sich mikr. stellenweise Verkalkung der Milzkapsel, Verkalkung des Epithels einzelner gewundener und gerader Harnkanälchen und einzelner Fasern und Fasergruppen in der Herzmuskulatur.

Im Experiment III — Injektion von 7,0 g, Tod nach 3 d., makr. negativ — fand sich mikr. stellenweise Verkalkung beider Pleuren, des Subperitoneums des Dünndarms und der Milz, weiter umschriebene Verkalkung des Epithels in einzelnen geraden und gewundenen Harnkanälchen.

Im Experiment IV — Injektion von 33,6 g, Tod nach 5 d., makr. weiße Streifen am Peritoneum des Magens und der Milz und Knirschen der Nieren beim Durchschneiden — fand sich mikr. stellenweise Verkalkung des Subperitoneums des Magens und der Milz, dann herdweise Verkalkung des Epithels einzelner gewundener und gerader Harnkanälchen und einzelner Muskelfasern des Herzens.

Im Experiment V — Injektion von 1,0 g, Tod nach 2 d., makr. negativ — fand sich mikr. hier und da umschriebene Bindegewebeverkalkung im großen Netze, weiter stellenweise Verkalkung in der Wand von Blutgefäßen des Herzens, des Magens, des großen Netzes und der Nieren und Verkalkung einzelner Leberzellen und Nierenepithelien.

Im Experiment XLVII — Injektion von 4,25 g, Tod nach 14 d., makr. viele weiße Streifen und Punkte in der Corticalis der l. Niere — fand sich mikr. ausgedehntere Verkalkung des Epithels vieler gewundener und spärlicher gerader Harnkanälchen in der Corticalis der l. Niere.

Blutungen waren bei diesen Experimenten im Experiment 42 in der Magenschleimhaut, in der Serosa des Darmes, in der Leber, den Nieren, im Endocard und in den Lungen zugegen, im Experiment 43 in der Mucosa des Magens und Duodenums, im Endocard und den Lungen, und im Experiment 44 in der Mucosa des Magens und im Endocard. Dieselben zeigten mikr. nur den Befund von Blutextravasation.

#### Injektion von $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ in Gewebe.

Diese Injektion wurde im Experiment 25 in die Subcutis am Thorax eines Kaninchens, im Experiment 26 in die Rückenmuskulatur eines Kaninchens, im Experiment 27 in die Leber eines Kaninchens und im Experiment 34 in die Beinmuskulatur eines Hundes gemacht.

Im Experiment 25 — Injektion von 3,0 g r. und 3 g l., Tod nach 18 d., makr. an den Injektionsstellen und in der benachbarten Muskulatur weißliche Flecken — fand sich mikr. an den Injektionsstellen um einzelne Kalkkrümel Verkalkung des Bindegewebes mit Riesenzellen und Verkalkung einzelner benachbarter Muskelfasern.

Im Experiment 26 — Injektion von 1 g r., 1 g l., Tod nach 8 d., makr. an den Injektionsstellen in der Muskulatur weißliche Verfärbung und am Peritoneum der l. Bauchwand ein weißlicher Fleck — fand sich mikr. an allen weißen Stellen Verkalkung der Muskulatur resp. des Subperitoneums.

Im Experiment 27 — Injektion von 0,5 g, Tod nach 22 d., makr. weiße Flecken und Streifen an der Leber, am Magen und an der unteren Fläche des Zwerchfells — fand sich mikr. an den weißen Stellen Verkalkung des Subperitoneums, weiter Verkalkung einzelner Muskelfasern des Zwerchfells und des Epithels einzelner gewundener Harnkanälchen.

Im Experiment 34 — Injektion von 2,0 g, Tod nach 52 d., makr. weiße Streifen in den injizierten Muskeln fand sich mikr. stellenweise Verkalkung der Media der Arterien im Bereiche der weißen Streifen.

In den Experimenten 25 und 26 zeigte der Magen punktförmige Ecchymosen in der Mucosa, welche sich mikr. wie peptische Erosionen verhielten.

#### Injektion von $\text{CaCl}_2$ in die Bauchhöhle.

Dieses Salz wurde im Experiment 20 verwendet und zwar wurden bei einem Kaninchen 0,5 g  $\text{CaCl}_2$  in die Bauchhöhle injiziert. Der Tod erfolgte nach 3 d. Makr. fanden sich viele kleine weiße Flecken am Peritoneum parietale und am Netze. Mikr. zeigte sich daselbst Verkalkung des Subperitoneums, ferner ergab sich Verkalkung einzelner Muskelfasern der Bauchwand, des Zwerchfells und kleiner Muskelfasergruppen in der Muscularis externa des Magens und Darms und Verkalkung einzelner kleiner Stellen der Media in den Arterien des Magens, Darms und Netzes.

Die Mucosa des Magens hatte viele Ecchymosen, die sich wie in den früheren Fällen verhielten.

#### Injektion von $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ gelöst durch $\text{H}_2\text{CO}_3$ in das Blut.

Bei 2 Kaninchen — Experiment LXXXI und LXXXII — wurde die Lösung in die Ohrvene gespritzt.

Im Experiment LXXXI — Injektion von 0,78 g, Tod nach 1 d., makr. negativ — war auch der mikrosk. Befund vollkommen negativ.

Im Experiment LXXXII — Injektion von 1,64 g, Tod nach 4 d., makr. neg. — fand sich mikr. nur Verkalkung einzelner ganz umschriebener Stellen des Leberperitoneums und kleinster Abschnitte des Epithels einzelner gerader Harnkanälchen.

#### Injektion von $\text{Mg}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$ in die Bauchhöhle.

Diese Injektion wurde bei einem Kaninchen — Experiment 38 — ausgeführt. Die Menge des injizierten Salzes betrug 6,0 g. Der Tod

erfolgte 28 d. nach der 1. Injektion. Makr. fanden sich in der Bauchhöhle eingekapselte Injektionsmassen, weiße Streifen am Peritoneum und steinartige Massen in den Mesenterialdrüsen. Mikr. zeigte sich in den weißen Streifen des Peritoneums Einlagerung amorpher Massen mit kleinzelliger Infiltration und Riesenzellenbildung in der Umgebung, ferner die gleiche Substanz in kleinen Herden im Epi- und Endocard und an der Wand der Blutgefäße des großen Netzes und in einzelnen Muskelfasern des Herzens. Die am großen Netze angestellte mikrochemische Kalkreaktion mit  $H_2SO_4$  ergab ein positives Resultat. Die Mesenterialdrüsen konnten ihrer steinartigen Härte wegen nicht geschnitten werden.

### Injektion von $CaCO_3$ , suspendiert in physiologischer $CaNa$ -Lösung in die Bauchhöhle.

Die Injektion wurde bei 2 Kaninchen — Experimente 30 und 31 und bei 2 Meerschweinchen — Experimente 36 und 37 ausgeführt.

Im Experiment 30 — Injektion von 6,0 g, Tod 10 d. nach der 1. Injektion, makr. Reste der Injektionsmasse im Bauchraum und weiße Flecken an vielen Stellen des Peritoneums — fanden sich mikr. viele Verkalkungsherde im Subperitoneum oft mit Entzündung in der Umgebung und zeigte sich ferner Verkalkung einzelner Muskelfasern in der vorderen Bauchwand und umschriebener Stellen des Epithels einzelner gewundener Harnkanälchen. Die Verkalkungsherde des Subperitoneums gaben öfters Kalkseifenreaktion.

Im Experiment 31 — Injektion von 3,0 g, Tod 6 d. nach der 1. Injektion, makr. Idem — zeigte sich mikr. um die Verkalkungsherde im Subperitoneum Entzündung; ferner bestand Verkalkung kleiner Abschnitte des Epithels einzelner gewundener Harnkanälchen, einzelner Glomeruli und kleiner Stellen der Intima und Media der Nierenarterien. Die Verkalkungsherde im Subperitoneum gaben bei Lösung durch  $ClH$  Gasblasen, die Nierenverkalkung keine solchen.

Im Experiment 36 — Injektion von 1,4 g, Tod 11 d. nach der 1. Injektion, makr. Idem — fanden sich mikr. zahlreiche Verkalkungsherde im Subperitoneum mit Entzündung und einzelne verkalkte Muskelfasern in der Bauchmuskulatur.

Im Experiment 37 — Injektion von 1,4 g, Tod 7 d. nach der 1. Injektion, makr. Idem — zeigten sich mikr. viele Verkalkungsherde im Subperitoneum mit umgebender Entzündung, einzelne verkalkte Leberzellen in der Nähe der Kapselverkalkungen und verkalkte Epithelien in einzelnen geraden Harnkanälchen.

In dem Experiment 21 fanden sich in der Mucosa des Magens ziemlich viele Ecchymosen, die mikr. auch wieder wie peptische Erosionen aussahen.

**Injektion von  $\text{CaHPO}_4$  suspendiert in 0,9% ige  $\text{CaNa}$ -  
Lösung in die Bauchhöhle.**

Im Experiment 32 — Injektion von 6,0 g bei einem Kaninchen, Tod 17 d. nach der 1. Injektion, makr. in der Bauchhöhle reichliche abgekapselte Injektionsmasse und viele weiße Streifen und Flecken am Peritoneum parietale und viscerales — zeigten sich mikr. Verkalkungen des Subperitoneums mit Entzündung und Riesenzellenbildung in der Nachbarschaft. Die Kalkmassen lösten sich überall durch  $\text{ClH}$  ohne Gasbildung.

Die reichlichen Ecchymosen der Mucosa ventriculi glichen mikr. denen der früheren Fälle.

**Injektion von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  suspendiert in physiologischer  
Kochsalzlösung in die Bauchhöhle.**

Im Experiment 51 — Injektion von 3,0 g bei einem Kaninchen, Tod nach 3 Monaten, makr. Reste der Injektionsmasse von Bindegewebe umschlossen in der Bauchhöhle und weiße Streifen am Peritoneum — fanden sich mikr. reichliche Verkalkungsstellen im Subperitoneum mit umgebender Entzündung, weiter einzelne verkalkte Muskelfasern in der Bauchwand und in der Muscularis ventriculi. Um letztere bestand auch Entzündung.

**Injektion von  $\text{SrCO}_3$  suspendiert in physiologischer  
Kochsalzlösung in die Bauchhöhle.**

Im Experiment 39 — Injektion von 3,0 g bei einem Kaninchen, Tod 16 d. nach der 1. Injektion, makr. in der Bauchhöhle eingekapselte Injektionsmassen, weiße Streifen am Peritoneum und harte weiße Beschaffenheit der Mesenterialdrüsen — fanden sich mikr. im Subperitoneum zahlreiche Ablagerungen von Strontiumcarbonat, weiter solche Ablagerungen auch in einzelnen kleinen Gruppen von Epithelien einzelner gerader Harnkanälchen und in einzelnen Stellen der Wand von Blutgefäßen der Nieren. Die Mesenterialdrüsen konnten ob ihrer Härte nicht geschnitten werden.

Die Schlußfolgerungen, die ich aus diesen mikroskopischen Untersuchungen ziehe, sind folgende:

Die Gewebe, welche von der sekundären Kalkablagerung betroffen waren, waren augenscheinlich vorher stets normal gewesen.

Die Verkalkung hatte durchwegs die Bedeutung von „Kalkmetastasen“, d. h. die Kalksalze waren entweder bei der Injektion in das Blut direkt durch die Zirkulation verbreitet worden oder es war nach Resorption gelöster Kalksalze teils

in der Nähe der Injektionsstellen, teils entfernter davon zur sekundären Ablagerung der Kalksalze gekommen. Bei letzterem Vorgange zeigte die quergestreifte Muskulatur eine besondere Disposition zur Verkalkung.

In den Nieren hatte die Verkalkung den Charakter einer Secretionsverkalkung.

Die chemische Natur des verwendeten Kalksalzes hatte keinen Einfluß auf die Art der Verkalkung.

Die Entzündung und Riesenzellenbildung um die Verkalkung machte stets den Eindruck einer reaktiven Entzündung.

Die Ecchymosen in der Mucosa des Magens verhielten sich so wie sogenannte peptische Erosionen.

---

# Über den Einfluß von Magnesiumsalzen und Natriumsulfat auf die Harnacidität.

Von

L. de Jager (Leeuwarden).

(Eingegangen am 9. Dezember 1911.)

Mit 3 Figuren im Text.

In früheren Arbeiten<sup>1)</sup> habe ich gezeigt, daß durch Einführung von Calciumsalzen das Verhältnis der normalen Harnbestandteile mächtig beeinflußt wird.

Es hat sich ergeben, daß durch neutrale Calciumsalze der Ammoniakgehalt, sowie der Gehalt an freier Säure zunimmt, während der Phosphorsäuregehalt geringer wird; die Gesamtacidität nimmt beträchtlich zu. In der Nachperiode ist die Gesamtacidität niedriger als vor dem Versuch. Calciumlactat übt denselben Einfluß, der aber durch die alkalische Wirkung nicht deutlich zum Vorschein tritt.

Ich habe dieses so erklären wollen, daß nach Resorption der Calciumsalze eine Umsetzung stattfindet, wobei aus dem sekundären Natriumphosphat tertiäres Calciumphosphat gebildet wird, das irgendwo aufgespeichert wird<sup>2)</sup>. Dadurch würde dem Organismus Alkali entzogen werden; um das gestörte Gleichgewicht wieder herzustellen, wird ein saurer Harn ausgeschieden. Weiter kam ich zu der Schlußfolgerung, daß die Resorption des Calciums um so besser ist, je relativ weniger Calcium an Phosphorsäure gebunden ist. Ich möchte noch einen Schritt weiter gehen und die Hypothese aufstellen, daß Calcium nur dem Organismus zugute kommen kann, wenn es als neutrales Salz resorbiert worden ist, während resorbiertes Calciumphosphat vom Darm wieder ausgeschieden wird.

<sup>1)</sup> Centralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw. 1908, Nr. 15 und 16; 1909, Nr. 2; 1910, Nr. 7; 1911, Nr. 3.

<sup>2)</sup>  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{CaCl}_2 = \text{CaHPO}_4 + 2 \text{NaCl}$   
 $3 \text{CaHPO}_4 + 2 \text{NaHCO}_3 = \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$  oder  
 $2 \text{Na}_2\text{HPO}_4 + 3 \text{CaCl}_2 + 2 \text{NaHCO}_3 = \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + 6 \text{NaCl}$



Ob nun das Calcium als tertiäres Phosphat oder als Carbonat oder vielleicht als Calcium-Ion in organischer Bindung retiniert wird, lasse ich dahingestellt. Doch scheint es mir wahrscheinlich, daß ersteres der Fall ist, weil der Phosphorsäuregehalt des Harns regelmäßig eine Abnahme zeigt.

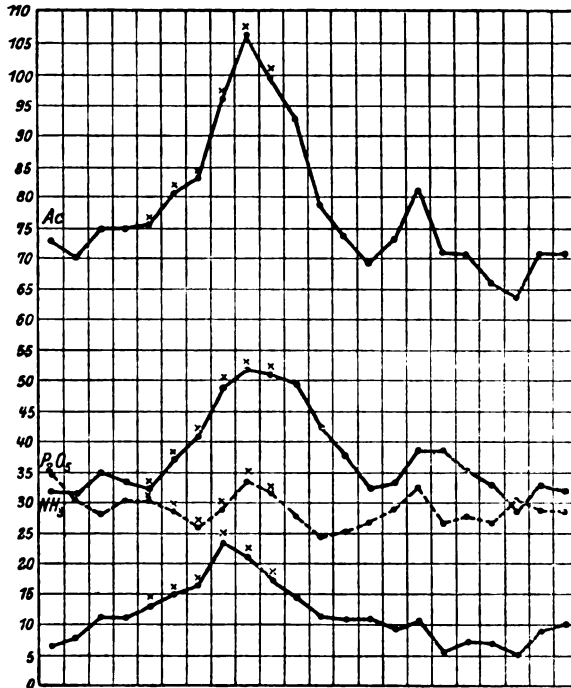


Fig. 1. 6 g  $\text{MgSO}_4$ .\*)

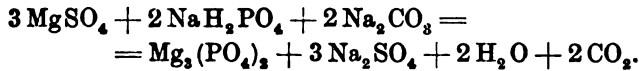
Es schien mir angebracht, ebenso wie ich es für Calciumsalze getan habe, den Einfluß von Magnesium zu eruieren.

Während sechs Tage nahm ich täglich 6 g Magnesiumsulfat in 4 über den Tag verteilte Gaben ein. Der Einfluß auf die Defäkation ist bei dieser Dosierung unbedeutend. Die Harnbestandteile werden stark beeinflusst (Fig. 1). Die Kurve ist derjenigen nach Calciumsulfateinfuhr sehr ähnlich, doch ist

\*) Zu den Figuren: Die obere Kurve bedeutet die Gesamtacidität, die mittlere ununterbrochene den Ammoniakgehalt, die punktierte den Phosphorsäuregehalt, die untere den Gehalt an freier Säure.

die Zunahme des Ammoniakgehalts und des Gehalts an freier Säure ebenso wie der Gesamtacidität noch größer als bei dem Versuch mit Calciumsulfat. Die Acidität, die vor dem Versuch 70 bis 75 ccm n-NaOH entspricht, steigt an bis zu 105 ccm n-NaOH. Der Phosphorsäuregehalt nimmt an dem ersten Versuchstage ab und steigt dann wieder zu der früheren Höhe, um nach dem Versuch wieder niedriger zu werden.

Man könnte für dieses Verhalten dieselbe Erklärung aufstellen, wie ich es für den Einfluß des Calciums getan habe. Wenn dieses der Fall ist, so müßte tertiäres Magnesiumphosphat aufgespeichert werden. Dieses ist nicht sehr wahrscheinlich. Es würde folgende Umsetzung stattfinden müssen:



Der Verlust an Alkali würde 4 Äquivalente Na für 6 Äquivalente  $\text{MgSO}_4$  betragen. Eine Aciditätszunahme um 32 ccm n-NaOH entspricht in diesem Falle einer Resorption von 6 g des krystallinischen Magnesiumsulfats. Soviel Magnesium wird wahrscheinlich nicht resorbiert. Außerdem ist eine Aufspeicherung von Magnesium im Körper nicht wohl anzunehmen.

Es wäre auch möglich, daß im Darmkanal eine Umsetzung stattfindet zwischen Magnesiumsulfat und Calciumphosphat. Es entstehen dann Calciumsulfat und Magnesiumphosphat. Das Calciumsulfat wird resorbiert und übt dieselbe Wirkung, als wenn es eingenommen worden ist. Das Magnesiumphosphat bleibt im Darmkanal zurück und wirkt wie eine saure Verbindung, die imstande ist noch Alkali zu binden. Es wird dann auch hier Calcium vom Organismus retiniert werden. Ich fand auch jetzt eine unter der Norm liegende Acidität in der Nachperiode.

Wenn diese Erklärung richtig ist, so könnten auch andere neutrale Salze eine ähnliche Wirkung üben, d. h. von den durch Umsetzungen im Darmlumen entstandene Verbindungen sollen die am leichtesten resorptionsfähigen ihren Einfluß auf den Harn üben. Bei Umsatz von Magnesiumsulfat ist dieses das Calciumsulfat.

Anders wird sich die Sache beim Natriumsulfat verhalten; wenn auch hier ein Umtausch stattfindet, so wird neben Calcium-

sulfat Natriumphosphat entstehen. Von diesen beiden Körpern wird das letztere leichter resorbiert als das Calciumsulfat. Der Versuch bestätigte diese Annahme (Fig. 2). (Es wurde während 6 Tagen je 8 g Natriumsulfat eingenommen.) Am ersten Tag des Versuches nimmt der Gehalt an Ammoniak und an freier Säure und ebenso die Gesamtacidität beträchtlich ab, während der Phosphorsäuregehalt eine Zunahme zeigt, ganz wie ich es früher für Natriumphosphat gefunden habe. An den folgenden Tagen aber wird das Gleichgewicht wieder hergestellt, weil beide Verbindungen resorbiert werden und auch das resorbierte Calcium eine gerade entgegengesetzte Wirkung ausübt. Diese Wirkung überdauert, wie aus der Kurve ersichtlich ist, die Versuchsperiode.

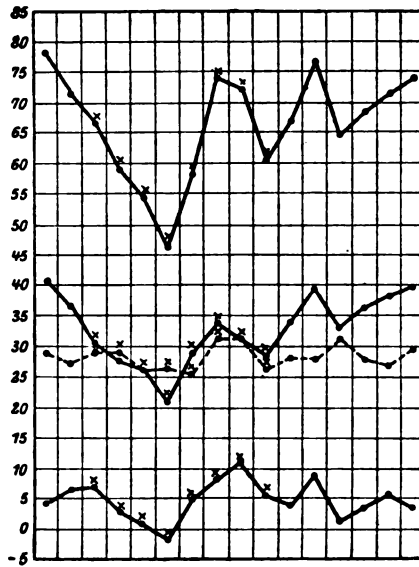


Fig. 2. 1 g MgO.

Ein anderer Einfluß als vom Magnesiumsulfat ließ sich vom Magnesiumoxyd erwarten. Einerseits hat man es hier mit einer alkalischen Verbindung zu tun, doch darf man ebenso wie beim Calciumlactat und Calciumcarbonat eine gemischte Wirkung erwarten.

Wie der Versuch lehrt (Fig. 3), ist dieses der Fall. Ich nahm während 8 Tagen täglich 4 mal 250 mg Magnesia usta.

An den ersten Tagen nimmt die Harnacidität regelmäßig ab, eine Abnahme, an der alle Komponenten teilnehmen. Nach dem 4. Tage gehen alle Kurven wieder in die Höhe. Die Kurve ist in dem aufsteigenden Schenkel nicht regelmäßig, doch ist dieses nicht zu vermeiden, weil es wohl unmöglich ist, während der Versuche, wie ich sie anstelle, eine uniforme Diät innezuhalten. Ich habe meine bisherigen wie meine früheren Versuche bei gewöhnlicher Diät angestellt, bin aber gewohnt,

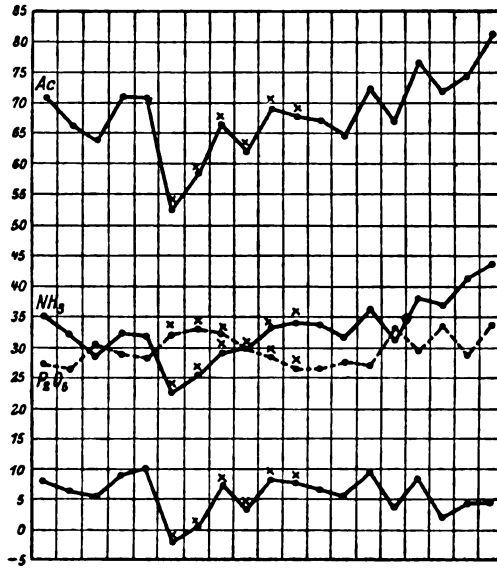


Fig. 3. 8 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

täglich eine im großen und ganzen sich gleichbleibende Nahrungsmenge zu mir zu nehmen. Doch geht aus der Kurve deutlich hervor, daß Magnesiumoxyd an den ersten Tagen eine alkalische Wirkung ausübt, die aber bald durch die Wirkung des Magnesiums aufgehoben wird. Auch ohne die Acidität zu bestimmen, ist dieses zu sehen. Während an den ersten Tagen des letzteren Versuchs mit Magnesia usta der Harn in den Nachmittagen trübe war, wurde die Trübung von dem Tagesharn größtenteils wieder gelöst. An den folgenden Tagen aber hörte diese Erscheinung auf und war der Harn den ganzen Tag klar. Dasselbe habe ich bei einem Phosphaturiker

wahrgenommen, nur in stärkerem Maße. Unter dem Einfluß von Magnesiumsulfat war der Harn klar geworden, als ich darauf *Magnesia usta* verschrieb, wurde der Harn dick-trübe; nach einigen Tagen war der Harn wieder klar geworden, ohne daß die Medikation ausgesetzt worden war.

Ich habe oben die Wirkung des Magnesiums zum Teil einer Umsetzung im Darmkanal zugeschrieben. Nur auf diese Weise schien mir das Verhalten erklärlich zu sein, vor allem weil, wie meine Versuche ergaben, nicht nur der Magnesiumgehalt, sondern auch der Gehalt an Calcium vermehrt ist. In den mitgeteilten Versuchen habe ich den Gehalt an Calcium nicht bestimmt, sondern, wie ich früher angegeben habe, aus den Titrierungswerten mit und ohne Zusatz von Kaliumoxalat berechnet. Um genauere Angaben zu bekommen, habe ich einen zweiten Versuch mit Magnesiumsulfat während 4 Tage angestellt. Der Erfolg war derselbe, so daß die erhaltene Kurve nicht mitgeteilt zu werden braucht. Nur möchte ich den Gehalt an  $\text{CaO}$  und  $\text{MgO}$  mitteilen.

Ich habe diese Bestimmungen nach folgender Methode gemacht. 100 ccm Harn werden mit 30 ccm Ammoniak versetzt und erwärmt, bis der Niederschlag der Erdphosphate sich klumpig zusammengeballt hat. Dieser Niederschlag wird abfiltriert, mit ammoniakhaltigem Wasser ausgewaschen und durch Übergießen des Filters mit heißer, verdünnter Salzsäure gelöst. Die Lösung wird mit Natronlauge neutralisiert, bis eine Trübung auftritt, die in Essigsäure gelöst wird. Diese Lösung wird zum Kochen erhitzt, mit einer heißen Lösung von 0,5 g Ammoniumoxalat versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Das Calciumoxalat wird abfiltriert und der Gehalt an Calcium durch Titrieren mit Kaliumpermanganat bestimmt.

Das Filtrat wird mit Ammoniak versetzt, nach 24 Stunden filtriert und aus dem Phosphorsäuregehalt der Magnesiumgehalt berechnet. Die Bestimmung der Phosphorsäure mittels Uraniumnitrat wird sehr erleichtert, wenn die Suspension des Tripelphosphats, bevor Essigsäure zugesetzt wird, einige Zeit gekocht wird, um das Ammoniak zu entfernen.

Vorversuche haben gezeigt, daß diese Methode gute Resultate ergibt. Die Methode hat einige Vorteile gegenüber der direkten Ausfällung des Calciumoxalats aus dem Harn. Die Niederschläge des

Calciumoxalats und des Tripelphosphats sind rein weiß, während sie sonst oft gefärbt erscheinen. Man kann den trüben Harn sofort in Arbeit nehmen. Setzt man zum Harn Ammoniumoxalat hinzu, so bleiben etwaige suspendierte organische Bestandteile auf dem Filter zurück, die imstande sind, Kaliumpermanaganat zu reduzieren. Nach der beschriebenen Methode bleiben diese nach Lösung der Erdphosphate in Salzsäure auf dem Filter zurück. Und drittens geht das Filtrieren, obwohl einmal öfter filtriert wird, um vieles leichter vonstatten.

Ich habe diese Bestimmungen noch an einigen Tagen des Versuchs mit *Magnesia usta* gemacht und teile die Zwischenperiode in Zeitabschnitte von je 4 Tagen ein. Als Tagesmittel finde ich folgende Zahlen:

	Gehalt an	
	CaO	MgO
	g	g
Versuch mit 1 g MgO	0,301	0,300
	0,261	0,183
	0,257	0,151
	0,274	0,173
	0,245	0,114
Versuch mit 6 g MgSO <sub>4</sub>	0,304	0,293
	0,269	0,221

An den 12 Tagen, die dem Versuch mit Magnesiumsulfat vorhergehen, hat der Gehalt an CaO im Mittel 0,259 g, an MgO 0,146 g betragen. Die Zunahme beider Körper tritt also deutlich zutage. Noch deutlicher geht das Verhalten aus den Tagesbestimmungen hervor. Der Gehalt betrug während des Versuchs:

	CaO	MgO
1. Tag MgSO <sub>4</sub>	0,264	0,185
2. „ „	0,312	0,273
3. „ „	0,312	0,349
4. „ „	0,321	0,364
1. Tag nach dem Versuch	0,317	0,319
2. „ „ „ „	0,267	0,219
3. „ „ „ „	0,281	0,180
4. „ „ „ „	0,209	0,168

Beide nahmen von Tag zu Tag zu, um nach dem Versuch wieder abzunehmen. Die sehr niedrige Mittelzahl an den 4 Tagen, die dem Versuch unmittelbar vorangehen, ist wahrscheinlich die Folge einer leichten Verdauungsstörung an dem diesen 4 Tagen vorhergehenden Tage. An diesem und dem folgenden Tage habe ich keine Bestimmungen gemacht. Die Mehrausscheidung während und nach dem Versuch beträgt im ganzen für das Calciumoxyd ungefähr 0,250 g, für das Magnesiumoxyd 0,900 g. Eingeführt ist ungefähr 4,0 g  $\text{MgO}$ .

Eine Mehrausscheidung von Calcium und Magnesium im Harn beweist nicht, daß mehr resorbiert worden ist. Dies kann auch verursacht sein durch eine geringere Ausscheidung durch den Darmkanal oder durch einen Verlust des Organismus an Calcium und Magnesium. Letzteres ist wohl nicht anzunehmen. Wenn dieses der Fall wäre, so müßte ein regelmäßiger Gebrauch von Bitterwasser für den Organismus sehr verhängnisvoll sein. Es scheint mir die Zunahme des Calciums auf eine Zunahme der Resorption hinzuweisen. Das ist nur so zu erklären, daß, wie ich oben angegeben habe, im Darmkanal Calciumsulfat gebildet wird. Um zu eruieren, ob diese Umsetzung stattfinden kann, habe ich folgende Versuche angestellt.

Eine 2,5%ige Lösung von Magnesium- resp. Natriumsulfat wurde während 24 Stunden mit sekundärem Calciumphosphat stehen gelassen. Dann wurde in der filtrierten Flüssigkeit der Gehalt an Calcium und an Phosphorsäure bestimmt. Derselbe betrug in dem Versuch

mit $\text{MgSO}_4$ für 100 ccm	31,64 mg	$\text{CaO}$	und	44 mg	$\text{P}_2\text{O}_5$ .
„ $\text{Na}_2\text{SO}_4$ „ 100 „	22,68 „	$\text{CaO}$ „	38 „	$\text{P}_2\text{O}_5$ .	

Wenn Calciumphosphat einfach gelöst worden war, so müßte der Gehalt an Phosphorsäure im ersten Versuch 40,12 mg, im zweiten 28,76 mg betragen haben. Es enthalten also die erstere Lösung außer Calciumphosphat noch 5,64 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$  in der Form von  $\text{MgHPO}_4$ , die zweite Lösung 9,24 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$  als  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Es ist schwer zu sagen, ob in den Lösungen  $\text{CaSO}_4$  enthalten ist, doch beweisen die Versuche, daß bei Gegenwart von Sulfat mehr Calciumphosphat in Lösung gegangen ist. Es ist also die Möglichkeit, daß derselbe Vorgang im Darmkanal stattfindet, nicht von der

Hand zu weisen, und nur so sind meine Befunde zu erklären. Die sehr starke Abnahme der Harnacidität unter dem Einfluß von  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  beweist eine Resorption von Natrium-Ionen ohne die dazu gehörige Säure. Wenn es sich aber um eine Resorption von Na-Ionen handelt, während das  $\text{SO}_4$ -Ion zurückblieb, so wäre nicht erklärt, warum an den folgenden Tagen nicht dasselbe stattfindet. Die Sache ist aber erklärlich, wenn im Darmkanal aus  $\text{CaHPO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sich  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und  $\text{CaSO}_4$  bilden. Die Kurve für den Versuch mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird sich in diesem Falle aus den Kurven für  $\text{CaSO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  zusammensetzen, wie es denn auch in der Tat der Fall ist<sup>1)</sup>.

Die Wirkung des Magnesiumsulfats kann nur so erklärt werden, daß tertiäres Phosphat gebildet wird. Aus der nachherigen Abnahme der Harnacidität geht ebenso wie bei neutralen Calciumsalzen hervor, daß das gebildete tertiäre Phosphat im Körper aufgespeichert wird.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß es nicht gleichgültig ist, ob zur Regulierung des Stuhlgangs Bittersalz oder Glaubersalz benutzt wird. In Fällen, wo der Organismus durch eine Acidosis bedroht wird, kann Magnesiumsulfat gefährlich werden. Umgekehrt wird man, wo ein trüber Harn ausgeschieden wird, kein Natriumsulfat verabreichen, sondern eher Bittersalz verschreiben.

Die Versuche zeigen weiter den Weg zur Behandlung verschiedener Steindiathesen. Es ist von alther bekannt, daß durch Einverleibung von Alkalien ein weniger stark saurer Harn ausgeschieden wird, während umgekehrt durch Säureeinfuhr die Harnacidität zunimmt.

Die Steindiathesen, die in erster Linie in Betracht kommen, sind die Uratdiathese, die Oxalurie und die Phosphaturie. Bei letzterer Krankheit ist Phosphorsäure empfohlen worden. Doch scheint mir diese Therapie nicht empfehlenswert. Der regelmäßige Gebrauch stärkerer anorganischer Säuren ist für die Magenverdauung nicht gleichgültig. Jedenfalls ist es besser, keine Säure in den Magen einzuführen, wenn derselbe Erfolg auf andere Weise zu erreichen ist. Man hat es bei der Phosphat-

---

<sup>1)</sup> Diese Kurven sind zu finden im Centralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels 1909, Nr. 2.



urie nicht mit einer vermehrten Phosphorsäureausscheidung zu tun, sondern mit einer Kalkariurie. Doch ist auch letztere Bezeichnung nicht richtig. Es ist gleichgültig, wieviel Calcium der Harn enthält, wenn nur keine sekundären Phosphate anwesend sind, d. h. wenn der Harn neben sauren Phosphaten noch freie Säure enthält. Letzteres ist beim Phosphaturiker nicht der Fall. Der Harn enthält sekundäres Phosphat. Es ist möglich, daß der Tagesharn noch einen Überschuß an freier Säure enthält, der Harn aber an gewissen Tageszeiten trübe gelöst wird. Wo diese Fälle auf einer Hyperacidität des Magens beruhen, da wird sich der Zustand durch eine Alkalitherapie nur verschlimmern. Während die überschüssige Säure sonst im Darm wieder neutralisiert wird und zur Ausscheidung eines Harns mit erhöhter Acidität Anlaß gibt, wird durch Alkali-einfuhr die Acidität des Harns noch mehr verringert. Am verhängnisvollsten ist in dieser Hinsicht Natriumbicarbonat, am wenigsten gefährlich Calciumcarbonat. Doch kann durch Kreide die Magenhyperacidität zunehmen. Ist der Harn nicht nur nach den Hauptmahlzeiten, sondern den ganzen Tag über trübe, so sind Alkalien und selbstverständlich auch die alkalischen Wässer gegenindiziert. Die Phosphaturie ist mit Erfolg zu bekämpfen durch neutrale Calcium- und Magnesiumsalze. Zwar nimmt der Gehalt des Harns an Erdalkalien zu, aber diese sind in löslicher Form anwesend. In einem Fall von Phosphaturie mit Nierensteinbildung fand ich eine Harnacidität von 60,59 cem n-NaOH, einen Gehalt an freier Säure von — 1,58, mit einem Phosphorsäuregehalt von 2,432 g im Tag. Unter Einfluß von 5 g Calciumsulfat pro Tag waren diese Zahlen 73,24, + 6,58 cem n-NaOH und 2,105 g  $\text{P}_2\text{O}_5$ . An den 4 folgenden Tagen blieb der Harn klar und fand ich für diese Werte 66,11 resp. 2,67 cem n-NaOH und 2,043 g  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Es gelingt also, wie zu erwarten war, durch Calciumsulfat den Phosphatniederschlag zum Verschwinden zu bringen. In einem zweiten Falle wurde der Harn sofort klar unter Einfluß von 6 g Magnesiumsulfat. Welche von beiden Verbindungen den Vorzug verdient, ist von mehreren Umständen abhängig. Wenn neben Calciumphosphat Oxalatkristalle anwesend sind, wird Magnesiumsulfat den Vorzug haben, weil Calciumoxalat bei einem relativ hohen Magnesiumgehalt besser gelöst bleibt. Doch

sind dazu mehrere Versuche erforderlich. In dem oben zitierten Falle von Phosphaturie waren regelmäßig Oxalatkrystalle anwesend. Während Calciumsulfat verabreicht wurde, fehlten die Oxalatkrystalle vollständig, so daß durch vermehrte Calciumeinfuhr jedenfalls die Oxalurie nicht verschlimmert wird. Ein günstiger Einfluß kann hingegen gerade durch Calciumsalze geübt werden, weil dadurch die in der Nahrung enthaltene Oxalsäure im Darmkanal zu Calciumoxalat gebunden wird und der Resorption weniger anheimfällt. Durch Magnesiumsalze hingegen kann das Oxalat des Harns zwar gelöst werden, es ist aber auch möglich, daß dadurch die Resorption gerade gefördert wird. In einem Falle von reiner Oxalurie scheint mir ein Versuch mit Calciumsulfat jedenfalls erlaubt. Von Ueber<sup>1)</sup> wird bei Oxalurie Magnesia anempfohlen. Ich möchte hinzufügen, daß in dieser Hinsicht Magnesiumsulfat und vielleicht das Chlorid nicht mit dem Carbonat oder Oxyd gleichwertig sind, weil, auch wenn mit diesen Verbindungen das Oxalat in Lösung gebracht wird, die Löslichkeit der Phosphate vermindert wird und die Gefahr droht, daß die gebildeten Oxalatsteine mit einem Phosphatmantel umhüllt werden.

Ob für die Uratsteinbildung, wo die Verhältnisse anders liegen, aus diesen Ursachen etwas hervorzubringen ist, ist mir, da mir eigene Erfahrung fehlt, nicht bekannt. Nur möchte ich darauf hinweisen, daß, wo in diesen Fällen ein schwach saurer Harn angestrebt wird, vielleicht Magnesia usta zu empfehlen sein würde. Nach einer kurzdauernden Periode, wo die Acidität stark abgenommen hat, bleibt die Acidität weiterhin niedrig, ohne jedoch so weit wie beim Natrumbicarbonat herabzusinken. Das von von Noorden<sup>2)</sup> empfohlene Calciumcarbonat scheint mir hier weniger empfehlenswert, weil Urate unter dem Einfluß von Calciumphosphat leichter ihr Alkali abgeben als an Alkaliphosphate und Calciumcarbonat eine Zunahme des Harncalciums bewirkt. Doch liegen hier die Verhältnisse so verwickelt, daß ich diese Meinung der Erfahrung gegenüber nicht verteidigen möchte.

---

<sup>1)</sup> F. Ueber, Lehrbuch der Ernährung und der Stoffwechselkrankheiten S. 372.

<sup>2)</sup> Handbuch der Stoffwechselfathol. 2, 565.

Belegtablelle zu den Arbeiten über den Einfluß des Magnesiums.

Datum	Harnmenge	S. G.	Gesamt-Acidität n-NaOH ccm	Phosphor- säure	Ammo- niakstick- stoff	Freie Säure n-NaOH ccm	Bemerkungen
23. VIII.	1210	1,025	73,19	2,450	0,449	6,61	
24.	1050	1,0255	70,11	2,179	0,441	7,92	
25.	930	1,025	74,84	2,000	0,490	11,68	
26.	1080	1,0225	74,92	2,153	0,468	11,18	
27.	980	1,0245	75,33	2,132	0,453	12,97	6 g MgSO <sub>4</sub>
28.	820	1,029	80,48	2,025	0,518	14,96	6 „ „
29.	820	1,031	82,94	1,850	0,567	16,38	6 „ „
30.	900	1,029	95,94	2,070	0,687	23,73	6 „ „
31.	1250	1,0255	105,93	2,375	0,726	20,60	6 „ „
1. IX.	960	1,0267	99,75	2,256	0,712	17,10	6 „ „
2.	740	1,0305	92,85	1,996	0,699	14,76	
3.	1020	1,020	78,60	1,734	0,593	11,85	
4.	960	1,023	74,01	1,800	0,531	10,74	
5.	760	1,029	69,65	1,881	0,452	10,86	
6.	1160	1,024	72,92	2,100	0,471	9,70	
7.	910	1,026	81,68	2,310	0,541	10,32	
8.	690	1,030	71,26	1,898	0,541	5,90	
9.	1020	1,0215	70,78	1,964	0,493	7,94	
10.	1110	1,0195	66,11	1,887	0,458	6,78	
11.	1000	1,0235	64,22	2,150	0,399	5,44	
12.	780	1,0275	71,12	2,087	0,459	9,25	
13.	760	1,029	70,43	2,014	0,447	10,14	
14.	830	1,030	52,52	2,284	0,320	- 2,46	8 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
15.	1220	1,021	58,38	2,318	0,359	0,25	8 „ „
16.	1010	1,023	66,73	2,146	0,410	7,21	8 „ „
17.	1220	1,019	61,97	2,044	0,418	3,16	8 „ „
18.	1350	1,018	69,15	1,991	0,463	8,02	8 „ „
19.	750	1,030	67,83	1,894	0,473	7,41	8 „ „
20.	1110	1,0195	66,83	1,915	0,466	6,56	
21.	1500	1,0165	64,78	1,950	0,441	5,81	
22.	1220	1,0175	72,37	1,922	0,404	9,32	
23.	990	1,024	67,05	2,302	0,436	3,48	
24.	1330	1,018	76,58	2,128	0,542	7,80	
25.	1040	1,023	72,24	2,366	0,517	2,00	
26.	1300	1,018	74,80	2,080	0,573	4,55	
27.	1130	1,021	81,13	2,373	0,594	4,35	
4. X.	1500	1,017	73,48	2,025	0,567	4,46	
5.	1500	1,016	70,79	1,950	0,515	6,58	
6.	1050	1,020	66,04	2,021	0,426	7,11	1 g MgO
7.	1600	1,015	59,03	2,000	0,392	2,86	1 „ „
8.	1360	1,0165	54,88	1,870	0,372	1,72	1 „ „
9.	1240	1,018	45,91	1,891	0,295	- 1,80	1 „ „
10.	1340	1,017	58,43	1,776	0,399	4,92	1 „ „
11.	1720	1,0145	73,68	2,279	0,470	8,04	1 „ „
12.	1440	1,015	71,82	2,160	0,433	10,44	1 „ „
13.	920	1,023	60,02	1,909	0,393	5,10	1 „ „
14.	1400	1,017	66,40	1,995	0,480	4,00	
15.	1340	1,015	76,26	1,972	0,552	9,08	
16.	1400	1,016	64,84	2,205	0,461	0,88	
17.	1250	1,017	68,08	2,000	0,508	3,66	
18.	1120	1,0185	70,79	1,932	0,533	5,50	
19.	1010	1,0225	73,30	2,146	0,559	3,23	

Die Gesamtacidität gibt die Summe von Phosphorsäure, Ammoniak und freier Säure an. Näheres über diese Bestimmung sind zu finden in Zeitschr. f. physiol. Chem. 55 und Centralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw. 1908, Nr. 15 u. 16.

## Über die Glucose des Blutserums.

Von

Leonidas Doxiades.

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

(Eingegangen am 17. Dezember 1911.)

Beobachtungen über die Maltase des Blutserums, die ich unter Leitung von Prof. F. Röhm ann ausführte<sup>1)</sup>, hatten die Veranlassung gegeben, zu untersuchen, ob die Maltase des Blutserums in konzentrierten Lösungen von Traubenzucker ähnlich wirke wie die Maltase der Hefe nach den bekannten Versuchen von A. Croft-Hill, d. h. ob sie imstande ist, aus d-Glucosemolekülen Di- bzw. Polysaccharide aufzubauen, eine Wirkung, die entsprechend einem Vorschlage von Euler<sup>2)</sup> als Glucose bezeichnet werden mag.

Ich fand, daß das Drehungsvermögen einer 20%igen bzw. 30%igen d-Glucoselösung tatsächlich zunahm, wenn man sie mit Blutserum in der Wärme stehen ließ. Es lag also die Möglichkeit vor, daß sich Maltose oder ein anderes neues Produkt von größerem Drehungsvermögen, als es der Traubenzucker besitzt, bildete.

Im folgenden sollen weitere Beobachtungen über die Wirkung des Blutserums auf konzentrierte Glucoselösungen, über die Glucose des Blutserums, mitgeteilt werden.

In Blutserum, das meist vom Schweine stammte und durch Zusatz von 1%igem Fluornatrium vor der Zersetzung durch Bakterien geschützt wurde, wurde eine abgewogene Menge reinen, feinpulverisierten Traubenzuckers eingetragen und unter Um-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 32, 410, 1911.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 74, 13, 1911.

rühren gelöst. Die Lösung wurde in einem Meßkölbchen mit Serum bis zur Marke aufgefüllt und in einem gut verschlossenen Gefäß in einem auf etwa 37°C eingestellten Wärmeschrank stehen gelassen.

Von Zeit zu Zeit wurden Proben entnommen und in diesen das Drehungs- und Reduktionsvermögen bestimmt.

5 ccm wurden mit der Pipette aufgesaugt und in einem Meßkolben von 25 bzw. 50 ccm mit Alkohol bis zur Marke versetzt. Es wurde durch ein trockenes Faltenfilter filtriert und der Drehungswinkel im Zweidezimeterrohr bestimmt.

Eine andere Probe desselben Filtrats wurde abgemessen. Der Alkohol wurde auf dem Wasserbade vorsichtig verdampft. Dann wurde mit Wasser bis zu dem ursprünglichen Volumen wieder aufgefüllt. Nun wurden 30 ccm Allihnsche Kupferlösung, 30 ccm Allihnsche Seignettesalzlösung und 60 ccm Wasser zum Sieden erhitzt. Hierzu wurden 10 bzw. 25 ccm der Zuckerlösung gegeben. Es wurde 2 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach kurzer Zeit wurde durch einen gewogenen Gooch-tiegel filtriert, mit heißem Wasser gewaschen, das Wasser durch Alkohol und Äther verdrängt, das Kupfer durch Glühen in Kupferoxyd übergeführt und gewogen. Durch Multiplikation mit 0,799 wurde die entsprechende Menge Kupfer berechnet, die mit den Zahlen der Weinschen Tabellen verglichen werden kann.

### Versuche.

Ver- such	Datum 1911	In 100 ccm Schweine- serum	Verdünnung	In der verdünnten Lösung			
				$\alpha$ 2 Dez.- Rohr	Reduktionsvermög. in ccm	mg CuO   Cu	
1	1. VI.	30 g d-Glu- cose	5 : 100	1° 30'	10	360	288
	3. VI.			1° 35'		344	275
	9. VI.			1° 38'		329	263
	1. VII.			1° 41'		319	255
2	29. VI.	20 g d-Glu- cose	bei Polarisation	2°	25	579	463
	2. VII.		5 : 100	2° 15'		535	428
	7. VII.		bei Reduktion	2° 17'		524	419
	19. VII.		10 : 100	2° 19'		510	408
3	29. VI.	10 g d-Glu- cose	5 : 50	1°	25	578	462
	2. VII.			1° 10'		541	433
4	29. VI.	5 g d-Glu- cose	5 : 50	0° 30'	25	302	242
	3. VII.			0° 36'		286	229
	20. VII.			0° 39'		262	210

Es fand, wie die Zahlen zeigen, unter dem Einfluß des Fluornatrium enthaltenden Bluteserums vom Schweine eine Um-

wandlung des Traubenzuckers statt, bei der das Drehungsvermögen zu-, das Reduktionsvermögen aber abnahm.

Eine ähnliche, wenn auch anscheinend erheblich schwächere Wirkung besitzt das Blutserum vom Hammel. Die Konzentration der Zuckerlösung war 15%. Die Verdünnung bei der Untersuchung 5 ccm : 50.

	$\alpha$	10 ccm reduzieren:	
1. Juni 1911	1° 30'	360 mg CuO	288 mg Cu
3. „ 1911	1° 33'	351 „ „	281 „ „
30. „ 1911	1° 34'	347 „ „	277 „ „

Auf Galaktose wirkte Schweineserum nicht ein. Die untersuchte Lösung war 20%ig; die Verdünnung bei der Untersuchung 5 : 50.

	$\alpha$
2. Juni 1911	2° 5'
10. „ 1911	2° 5'
4. Juli 1911	2° 5'
19. „ 1911	2° 5'

Durch zweistündiges Erwärmen auf 50° wurde die Wirkung des Schweineserums zerstört.

Untersuchte Lösung 10%ig. Verdünnung 5 : 50.

	$\alpha$	25 ccm reduzieren:	
6. Juli 1911	1°	579,4 mg CuO	463 mg Cu
17. „ 1911	1°	580 „ „	464 „ „
21. „ 1911	1°	579,2 „ „	462,9 „ „

Dies war aber nicht der Fall in einem anderen Versuche, in dem das Schweineserum vor dem zweistündigem Erwärmen auf 50° mit soviel  $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure versetzt worden war, daß die Flüssigkeit bei der Prüfung mit rotem Lackmoidpapier annähernd neutral reagierte.

Untersuchte Lösung 10%ig. Verdünnung 5 : 50.

	$\alpha$	25 ccm reduzieren:	
6. Juli 1911	1°	579 mg CuO	462 mg Cu
17. „ 1911	1° 13'	532 „ „	425 „ „

Hier war die Wirkung deutlich vorhanden. Das Verhalten von Reduktion und Polarisation sprechen für die Vermutung, daß sich Maltose bildete, ebenso die Untersuchung der Osazone, die aus dem Reaktionsprodukt erhalten wurden.

Die Serum-Zuckerlösung wurde, nachdem sie die entsprechende Zeit im Wärmeschrank gestanden hatte, zur Entfernung des Eiweißes mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mehrmals mit heißem Alkohol übergossen. Die Alkohol-extrakte wurden auf dem Wasserbade vorsichtig eingeengt. Der Alkoholrückstand wurde in Wasser gelöst, so daß die Lösung etwa 5% Zucker enthielt und mit etwas mehr als der berechneten Menge essigsaurem Phenylhydrazin etwa 1 $\frac{1}{2}$  Stunde im kochenden Wasserbade erhitzt.

Noch heiß wurde das Osazon abgesaugt und mehrmals mit heißem Wasser gewaschen (Osazon I). Aus dem Filtrat schied sich ein Niederschlag ab, der sich bei der mikroskopischen Untersuchung aus blaßgelben dünnen Schollen oder aus stechapfelförmigen Kugeln bestehend erwies. Er wurde auf einem Filter gesammelt, aus heißem Wasser umgelöst und über Schwefelsäure getrocknet. Hierauf wurden harzige Massen durch Waschen mit Äther entfernt (Osazon II).

Die Flüssigkeit, aus der sich das Osazon II ausgeschieden hatte, wurde unter erniedrigtem Druck auf etwa ein Drittel eingeengt. Hierbei schied sich ein weiterer Niederschlag aus (Osazon III).

Die Mengen der gewonnenen Osazone waren verhältnismäßig gering. Ihre Eigenschaften (Löslichkeit, Krystallform und elementare Zusammensetzung) ließen sich mehr oder weniger mit der Annahme vereinen, daß sie aus Gemengen von Glucosazon und Maltosazon bestanden.

Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

Ber. f. Glucosazon	60,3%	C	6,1%	H	15,6%	N
„ „ Maltosazon	55,3%	„	6,3%	„	10,7%	„
Gef. „ Osazon II, Vers. 2	55,3%	„	7,5%	„	11,6%	„
„ „ „ III, „ 1	56,7%	„	7,4%	„		
„ „ „ III, „ 4	59,8%	„	6,6%	„	14,1%	„

Die Versuche sollen fortgesetzt werden.

# Untersuchungen über die physikalisch-chemischen Grundlagen der Seliwanoffschen Lävulosereaktion.

Von

Harry Koenigsfeld.

(Aus der inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Augsburg.)

(Eingegangen am 18. Dezember 1911.)

Schon oft ist der Streit um die Zuverlässigkeit der sog. Seliwanoffschen<sup>1)</sup> Lävuloseprobe, die eigentlich zuerst von Ihl und Pechmann<sup>2)</sup> angegeben wurde, entbrannt [O. und R. Adler<sup>3)</sup>, Conrady<sup>4)</sup>, Ofner<sup>5)</sup>, Jolles<sup>6)</sup> 7), Borchardt<sup>8)</sup>].

Dementsprechend sind auch öfter Modifikationen der Probe angegeben worden. Als die bekanntesten erwähne ich die von Borchardt<sup>8)</sup>, Rosin<sup>9)</sup> 10), Jolles<sup>6)</sup>.

Tatsächlich geben auch Aldosen, besonders d-Mannose und Maltose bei zu starkem oder zu langem Erhitzen eine positive Resorcinreaktion. Trotzdem erhält man einwandfreie Resultate auch nach den ursprünglichen Angaben von Seliwanoff, sofern man die genügenden Kautelen beachtet.

In einer früheren Arbeit<sup>11)</sup> konnte ich durch eine große Reihe Versuche, z. T. die Resultate früherer Untersucher [z. B. Ofner<sup>5)</sup>, Voit<sup>12)</sup>, Malfatti<sup>13)</sup>] bestätigen, für eine einwands-

---

1) Seliwanoff, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 20, 181, 1887.

2) Ihl und Pechmann, Chem. Centralbl. 1885, 761.

3) O. und R. Adler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41.

4) Conrady, Chem. Centralbl. 1895, 362.

5) Ofner, Monatsh. f. Chem. 25, 611, 1904.

6) Jolles, Arch. f. Pharmaz. 7, 244, 1906.

7) Jolles, Münch. med. Wochenschr. 7, 1910.

8) Borchardt, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55, 241, 1908.

9) Rosin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 5 und 6.

10) Rosin, Beiträge z. wissenschaftl. Med. u. Chem.; Festschr. f. E. Salkowski, Berlin 1904.

11) Koenigsfeld, Zeitschr. f. klin. Med. 69, 3 u. 4, 1909.

12) Voit, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 2, 122, 1908/09.

13) Malfatti, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 544, 1909.



freie Seliwanoffsche Probe folgende Bedingungen aufstellen: Die Konzentration der HCl darf nicht mehr als 12 bis 12,5% betragen. Die Reaktion — Rotfärbung, Trübung und Niederschlag — muß nach 20 bis 30 Sekunden langem Kochen eingetreten sein. Ist in der zu untersuchenden Lösung Dextrose vorhanden, so darf diese nicht mehr als ca. 2% betragen, da sonst auch diese einen positiven Ausfall gibt. Der abfiltrierte Niederschlag muß in Alkohol mit schöner roter Farbe löslich sein. Bei nur geringen Mengen Lävulose tritt nur Rotfärbung oder Rotfärbung und Trübung, kein eigentlicher Niederschlag ein.

Es war nun von Interesse zu untersuchen, weshalb man sich nach diesen Vorschriften an scheinbar unbegründete Zahlen halten soll. Es muß doch ein innerer Grund vorliegen, aus dem Dextrose in etwas stärkerer Konzentration oder bei Anwesenheit von nur wenig größeren Mengen HCl oder bei etwas längerem Kochen eine chemische Probe liefern soll, die sie unterhalb gewisser Grenzen nicht gibt und die sonst nur durch einen anderen Körper, durch Lävulose, zustande kommt.

Durch Untersuchungen der neuesten Zeit ist nun die chemische Natur der Seliwanoffschen Probe dahin geklärt, daß ihr die Anwesenheit von Oxymethylfurfurol zugrunde liegt.

Als erster hat Neuberger<sup>1)</sup> darauf hingewiesen, daß dieses Furfurol-derivat bei einigen Farbenreaktionen von Zuckern, so bei der  $\alpha$ -Naphtholreaktion, eine Rolle spielt.

v. Ekenstein und Blanksma<sup>2)</sup> fanden bei ihren Untersuchungen zur Unterscheidung von Kunst- und Naturhonig, daß die rote Färbung, die ein ätherischer Auszug von Kunsthonig mit Resorcin und Salzsäure liefert, auf der Gegenwart von einem Körper beruht, den sie zunächst als  $\beta$ -Oxy- $\delta$ -methylfurfurol ansprachen und der mit dem aus Saccharose durch Erhitzen mit Oxalsäure zu gewinnenden Körper identisch war. Die Autoren sprachen schon die Ansicht aus, daß die Seliwanoffsche Probe auf der Anwesenheit von  $\beta$ -Oxy- $\delta$ -methylfurfurol beruhe, da sie aus Fructose durch Erhitzen mit Oxalsäure unter Druck diesen Körper gewinnen konnten, der dann eine positive Probe lieferte.

Ihre Untersuchungen wurden bestätigt durch Ville und Derrien<sup>3)</sup>. Wie das Methyloxyfurfurol soll auch das korrespondierende Methyl-

---

<sup>1)</sup> Neuberger, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 564, 1900/01.

<sup>2)</sup> v. Ekenstein und Blanksma, Chem. Weekblad 6, 217; Ref. Chem. Centralbl. 1509, 1909, II.

<sup>3)</sup> Ville und Derrien, Bull. Soc. Chim. de France 5, 895; Ref. Chem. Centralbl. 1699, 1909, II.

furfuroloxyd [vgl. Kiermayer<sup>1)</sup> <sup>2)</sup>] wirken, das bei der Reaktion, wie die Autoren anzunehmen geneigt sind, in Methyloxyfurfurol hydrolysiert wird.

Durch weitere Untersuchungen von Blanksma<sup>3)</sup> wird die Konstitution der ursprünglich als  $\beta$ -Oxy- $\delta$ -methylfurfurol angesprochenen Verbindung als  $\omega$ -Oxymethylfurfurol erwiesen.

Dann zeigen v. Ekenstein und Blanksma<sup>4)</sup> <sup>5)</sup>, daß beim Erhitzen von Hexosen mit verdünnten Mineralsäuren sich  $\omega$ -Oxymethylfurfurol bildet, das dann sofort weiter zersetzt wird unter Bildung von Lävulinsäure und Ameisensäure.

Da auch aus den Aldohexosen der Körper gebildet wird, der den positiven Ausfall der Seliwanoffschen Probe bedingt, scheint es nun erklärt zu sein, daß auch Dextrose manchmal eine positive Reaktion ergibt.

Es ist keine Frage, daß dies eine Rolle spielt. Doch entsteht, wie v. Ekenstein und Blanksma<sup>6)</sup> <sup>7)</sup> feststellten, aus den Ketohexosen viel leichter und schneller das Oxymethylfurfurol, nämlich aus Fructose und Sorbose zu 20 bis 25% in derselben Zeit, in der es aus Glucose, Galaktose, Mannose nur zu 1% entsteht.

Nun ist nach Borchardt, was bestätigt wurde, die Empfindlichkeitsgrenze für die Lävulosereaktion 0,05%. Würde nun die direkte Entstehung des Oxymethylfurfurols aus Dextrose eine Rolle spielen, so müßte die Empfindlichkeit für Dextrose 1% sein. Doch geben erst (vgl. oben) Dextroselösungen über 2 bis 2,5% eine positive Resorcinreaktion<sup>8)</sup>.

1) Kiermeyer, Diss. Basel 1895.

2) Kiermeyer, Chem.-Zeitg. 19, 1004; Ref. Chem. Centralbl. 214, 1895, II.

3) Blanksma, Chem. Centralbl. 539, 1910, I.

4) v. Ekenstein und Blanksma, Chem. Centralbl. 1961, 1910, I.

5) v. Ekenstein und Blanksma, ibid. 292, 1910, II.

6) v. Ekenstein und Blanksma, Chem. Weekblad 6, 217; Ref. Chem. Centralbl. 1509, 1909, I.

7) v. Ekenstein und Blanksma, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, 2355, 1910.

8) Ähnlich liegen übrigens die Verhältnisse bei der Ihl-Pechmannschen Diphenylaminprobe<sup>\*</sup>), die nach Untersuchungen von Jolles<sup>\*\*)</sup> noch bei 0,005%igen Lävuloselösungen, dagegen, wie ich schon früher mitteilte<sup>\*\*\*)</sup>, erst bei Dextroselösungen über 2,5% positiv ausfällt.

\* Ihl und Pechmann, Chem.-Zeitg. 1885, 451.

\*\* Jolles, Münch. med. Wochenschr. 7, 1910.

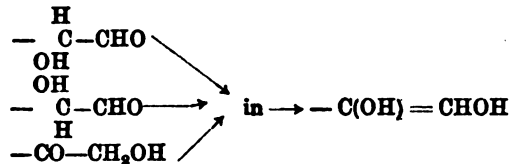
\*\*\* Koenigsfeld, Zeitschr. f. klin. Med. 69, 3 u. 4, 1909.

Es muß also noch ein anderer Grund vorliegen.

Da es sich bei Dextrose und Fructose um zwei chemisch so nahe verwandte Körper handelt, ist der naheliegendste Gedanke, daß der eine Stoff in den anderen umgewandelt wird, wenn man nicht die Vorschriften der Seliwanoffschen Probe genau beachtet, so daß dann erst sekundär nach der Umwandlung der Dextrose in Lävulose aus dieser der bei der Seliwanoffschen Probe wirkende Körper entsteht.

Daß tatsächlich eine Umwandlung von Dextrose in Lävulose unter dem Einfluß von Hydroxylgruppen eintreten kann, ist bekannt [Ausführliche Literatur darüber bei Neuberg<sup>1)</sup>].

Eine einfache Erklärung für diesen Übergang haben Wohl und Neuberg<sup>2)</sup> zu geben versucht, indem sie annahmen, daß Aldosen und Ketosen die gleiche Enolform liefern, d. h., daß alle 3 Atomgruppen



intermediär übergehen. Dieses Enol vermag dann alle drei Zuckerarten zu liefern.

Auf etwas anderem Wege scheint sich der von Rosin<sup>3)</sup> beobachtete Übergang des Traubenzuckers in Fruchtzucker zu vollziehen. Letzterer konnte durch Einwirkung starker HCl-Lösungen unter gleichzeitigem Erhitzen eine Umwandlung von Dextrose in Lävulose herbeiführen, die seiner Auffassung nach auf einer durch Hydrolyse hervorgerufenen Umlagerung der Aldogruppe zur Ketogruppe beruht. Auch durch längere (mehrstündige) Einwirkung der Hitze allein konnte er diese Umwandlung hervorrufen. Rosin hält das für einen ähnlichen Vorgang wie die Umlagerung der Moleküle bei der Herstellung von Indigorot aus Indigo-blau durch Sublimation<sup>4)</sup>.

Auch Ost<sup>5)</sup> gelang es, als er die Untersuchungen von Dierssen<sup>6)</sup> <sup>7)</sup> [vgl. auch Rosin<sup>3)</sup> und Erlenmeyer<sup>9)</sup>] nachprüfte, der bei seiner

<sup>1)</sup> Neuberg, Der Harn usw. Handbuch. Berlin 1911.

<sup>2)</sup> Wohl und Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 33, 3095, 1900.

<sup>3)</sup> Rosin, Beiträge z. wissenschaftl. Med. u. Chem.; Festschr. f. E. Salkowski, Berlin 1904.

<sup>4)</sup> Rosin, Virchows Archiv 123, 519, 1891.

<sup>5)</sup> Ost, Zeitschr. f. angew. Chem. 1170, 1905, II.

<sup>6)</sup> Dierssen, Zeitschr. f. angew. Chem. 1903, 128.

<sup>7)</sup> Dierssen, ibid. 1904, 1174.

<sup>8)</sup> Rosin, Chem.-Zeitg. 1903; Ref. 172.

<sup>9)</sup> Erlenmeyer, Journ. f. prakt. Chem. 71, 382, 1905.

Stärkehydrolyse Lävulose entstehen sah, aus Dextrose durch längere Einwirkung (4 Monate) starker kalter Schwefelsäure Fructose in reichlicher Menge zu erhalten.

Ich ging nun von dem Gedanken aus, daß sich all dies von einem Gesichtspunkt aus erklären läßt, wenn der Übergang von Dextrose in Lävulose nicht auf chemischen Umsetzungen beruht, sondern ein katalytischer Vorgang ist, wobei ich auf theoretische Erörterungen über das Wesen der Katalyse — hydrolytische Zwischenreaktionen usw. [vgl. Simon<sup>1)</sup> und Euler<sup>2)</sup>] — verzichten muß. (Ausführliche Literaturzusammenstellung über Katalyse s. bei Bredig<sup>3)</sup>).

Die von mir unternommenen, im folgenden mitgeteilten Versuche haben nun den Zweck, nachzuweisen, daß tatsächlich eine katalytische Umwandlung von Dextrose in Lävulose besteht.

Die Definition der Katalyse — die Wirkung eines Stoffes, der die Geschwindigkeit einer Reaktion verändert, und zwar meist erhöht, ohne daß er selbst bei dem Vorgange eine dauernde Änderung erfährt — setzt [vgl. Traube<sup>4)</sup>] die Annahme voraus, daß auch bei Abwesenheit des Katalysators die Reaktion stattfindet, zuweilen freilich mit unmeßbar kleiner Geschwindigkeit.

Ich konnte in Dextroselösungen von  $\frac{1}{2}$ , 1, 2,  $2\frac{1}{2}$ , 4 und 5 $\frac{0}{0}$ , die bei Zimmertemperatur gestanden hatten, nach 2 Monaten keine Umwandlung in Lävulose feststellen, was ja aber nach dem oben Gesagten nicht gegen eine Katalyse spricht.

Es ist bekannt, daß Säuren und Basen katalytisch beschleunigend auf verschiedene Vorgänge wirken, die sich in wässriger Lösung abspielen, und zwar ist nach der Theorie von Arrhenius<sup>5)</sup> die Wirkung der Anzahl der freien H-, resp. OH-Ionen proportional. Demnach muß die Wirkung des Katalysators mit seiner Menge wachsen.

Ich stellte meine Untersuchungen mit Dextroselösungen von  $\frac{1}{2}$ , 1, 2,  $2\frac{1}{2}$ , 4 und 5 $\frac{0}{0}$  an und benutzte zunächst Kalilauge als Katalysator<sup>6)</sup>.

1) Simon, Ref. Chem. Centralbl. 1361, 1903, II.

2) Euler, Zeitschr. f. physikal. Chem. 36, 641, 1901.

3) Bredig, diese Zeitschr. 6, 283, 1907.

4) Traube, Grundriß d. physikal. Chem. Stuttgart 1904.

5) Arrhenius, Theorien d. Chem. Leipzig 1906.

6) Über einen Vergleich der Wirkung verschiedener Basen auf die Umwandlung sind Untersuchungen im Gange.

## 1. Versuch.

Zu je 5 ccm Dextroselösung jeder Konzentration wurden zugesetzt

1. 1 ccm  $\frac{1}{10}$ -KOH
2. 2 „  $\frac{1}{10}$  „
3. 1 „  $\frac{1}{4}$  „
4. 2 „  $\frac{1}{4}$  „
5. Kontrolle: Zusatz von 1, resp. 2 ccm  $H_2O$ .

Nachdem ich die Kalilauge ca. 20 Stunden hatte einwirken lassen, stellte ich, natürlich immer mit allen Kautelen, die Seliwanoffsche Probe an, die folgendes Resultat hatte: die Kontrollröhrchen ergaben einen negativen Ausfall, die anderen einen positiven Ausfall, und zwar die mit  $\frac{1}{4}$ -KOH versetzten einen bedeutend stärkeren als die mit  $\frac{1}{10}$ -KOH versetzten, und die mit 2 ccm einen stärkeren als die entsprechende mit 1 ccm.

Auch die Zeitdauer der Einwirkung der Kalilauge auf die Dextrose ist von Einfluß, wie hervorgeht aus dem

## 2. Versuch.

Je 50 ccm von 2,  $2\frac{1}{2}$ , 4 und 5%ige Dextroselösung wurden mit je 10 ccm  $\frac{1}{10}$ -KOH versetzt (Kontrolle: Zusatz von 10 ccm  $H_2O$ ).

Dann stellte ich sofort und nach verschieden langer Einwirkung die Seliwanoffsche Probe an und polarisierte. Aufschluß über die Resultate gibt die folgende Tabelle:

	Polarisation				Seliw.
	2%	$2\frac{1}{2}$ %	4%	5%	
Kontrolle: Zusatz von $H_2O$	1,7	2,0	3,3	4,0	—
Zusatz v. KOH: sofort	1,7	2,1	3,3	4,0	schwache Rötung
nach 3 Std.	1,6	2,1	3,3	4,0	+
" 7 "	1,6	1,9	3,2	3,8	+
" 12 "	1,4	1,6	2,8	3,6	++
" 24 "	1,2	1,4	2,5	3,4	+++

Handelt es sich tatsächlich um eine katalytische Umwandlung, so darf die als Katalysator wirkende Kalilauge nicht verbraucht werden. Um hierfür den Nachweis zu erbringen, machte ich den

## 3. Versuch.

Zu je 50 ccm der verschiedenen Konzentrationen der Dextroselösungen setzte ich je 10 ccm  $\frac{1}{10}$ -KOH, resp.  $\frac{1}{4}$ -KOH (Kontrolle: Zusatz zu 50 ccm  $H_2O$ ).

Nach 20 Stunden fielen die Lävuloseproben wie in den vorigen Versuchen positiv aus. Ich titrierte dann mit  $\frac{1}{10}$ -, resp.  $\frac{1}{4}$ -HCl, um festzustellen, ob die Kalilauge verbraucht sei. Es ergab sich:

10 ccm der mit $\frac{1}{10}$ -, resp. $\frac{1}{4}$ -KOH versetzten Lösungen brauchten	$\frac{1}{10}$ -HCl	$\frac{1}{4}$ -HCl
Kontrolle	1,9	2,0
$\frac{1}{2}$ ‰	1,7	1,9
1 ‰	1,8	2,0
2 ‰	1,8	2,0
$2\frac{1}{2}$ ‰	1,9	1,9
4 ‰	1,9	1,9
5 ‰	2,0	2,0

Nach 40 Stunden ergab sich:

10 ccm der mit $\frac{1}{10}$ -, resp. $\frac{1}{4}$ -KOH versetzten Lösungen brauchten	$\frac{1}{10}$ -HCl	$\frac{1}{4}$ -HCl
Kontrolle	1,9	2,0
$\frac{1}{2}$ ‰	1,8	2,0
1 ‰	1,9	1,8
2 ‰	1,7	1,9
$2\frac{1}{2}$ ‰	1,9	2,0
4 ‰	1,9	1,9
5 ‰	1,8	1,9

Die sich teilweise ergebenden geringen Unterschiede von 0,1 und 0,2 ccm liegen meiner Meinung nach innerhalb der Grenzen unvermeidbarer Versuchsfehler. Man kann also aus dem Ergebnis dieser Versuchsreihe den Schluß ziehen, daß die zugesetzte Kalilauge nicht verbraucht wird und sich wieder völlig nachweisen läßt, also keine chemische Bindung eingeht.

Um aber den Einwand zu entkräften, daß diese geringen Mengen Kalilauge doch chemisch umgesetzt seien und dadurch die Umwandlung hervorgerufen wurde, machte ich den

#### 4. Versuch.

Zu je 50 ccm Dextroselösung jeder verwendeten Konzentration setzte ich 0,5 resp. 1,0 ccm von  $\frac{1}{10}$  und  $\frac{1}{4}$ -KOH, d. h. so viel als den bei der Titration gefundenen Unterschieden entsprach. Wenn es sich um einen chemischen Umsatz dieser Mengen handelte, müßte schon durch den Zusatz so kleiner Quantitäten nach 24 Stunden eine gleich große Umwandlung stattgefunden haben wie im vorhergehenden Versuch mit viel größeren Mengen, und die zugesetzte Kalilauge müßte völlig verbraucht sein, also die Lösung neutral reagieren. Beides war nicht der Fall; der hervorgerufene Übergang und dementsprechend der positive Ausfall der Seliwanoffschen Probe war viel geringer als nach Zusatz größerer Mengen Kalilauge, und die Lösungen reagierten, wie sich leicht durch Phenolphthalein nachweisen ließ, alkalisch.

Liegt eine katalytische Umsetzung vor, d. h. geht die Umwandlung auch ohne Zusatz der Kalilauge, des Katalysators,

wenn vielleicht auch mit unmeßbar kleiner Geschwindigkeit vor sich, so muß es möglich sein, durch Erhöhung der Temperatur diese Reaktionsgeschwindigkeit so weit zu erhöhen, daß der Vorgang der Invertierung durch die Seliwanoffsche Probe nachweisbar ist. Es ist ja z. B. für die Esterbildung der Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei 100° etwa 500mal größer als bei 8°. Es wächst die Reaktionsgeschwindigkeit in geometrischer Progression, wenn die Temperatur in arithmetischer Progression zunimmt. Und je höher die Temperatur gesteigert wird, desto überflüssiger wird ein Katalysator nach den Untersuchungen von Bredig<sup>1)</sup> über die Oxydationsgeschwindigkeit von Anilin und von Naphthalin durch konzentrierte Schwefelsäure mit und ohne Zusatz von Mercurisulfat.

Nun ist es schon Rosin<sup>2)</sup> gelungen, durch längere, mehrstündige Einwirkung der Hitze allein aus Dextrose Lävulose herzustellen.

Ich prüfte dies systematisch durch im

#### 5. Versuch.

Je 50 ccm von 1, 2 und 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> %iger Dextrolösung wurden auf 50, 75 und 100° erwärmt und nach 3, 4, 5 und 6 Stunden die Lävulose-Probe angestellt. (Selbstverständlich wurden alle erforderlichen Kautelen, ein Auffüllen des durch Verdampfen Verlorengegangenen usw. beachtet.) Die Proben fielen positiv aus, und zwar bei den auf 100° erwärmten viel stärker als bei den auf 50 und 75° erwärmten, und bei den auf 75° erwärmten stärker als bei den auf 50° erwärmten. Einen deutlichen Unterschied entsprechend der Zeit der Erwärmung konnte ich nicht feststellen.

Es handelt sich bei dieser Umwandlung der Glucose in ihr Isomeres um den einfachsten Fall einer umkehrbaren Reaktion in homogenen Systemen.

Schon Berthollet hat nun (1801) die Ansicht ausgesprochen, daß die chemische Wirkung von den Massen der wirkenden Körper abhängig ist. Guldberg und Waage<sup>3) 4)</sup> nahmen diese Ansicht wieder auf,

<sup>1)</sup> Bredig, diese Zeitschr. 6, 283, 1907.

<sup>2)</sup> Rosin, Beiträge z. wissensch. Med. u. Chem. Festschrift für E. Salkowski, Berlin 1904.

<sup>3)</sup> Guldberg und Waage, Christiania Videnskabselskabs Forhandlingler 1864/65.

<sup>4)</sup> Guldberg und Waage, Étud. sur les affin. chim. Univ.-Progr., Christiania 1867.

wenn sie freilich auch erst in der dritten Bearbeitung ihres Gesetzes<sup>1)</sup> zu einer zweckmäßigen kinetischen Betrachtungsweise übergangen. Dieses Gesetz besagt, daß die Geschwindigkeit eines chemischen Vorganges dem Produkt der Konzentrationen der aufeinander wirkenden Stoffe proportional ist, abgesehen von dem Geschwindigkeitskoeffizienten.

Demnach muß die Geschwindigkeit um so mehr erhöht sein, je stärker die Konzentration der Dextroslösungen ist, d. h. die Seliwanoffsche Probe muß nach der Invertierung bei den stärkeren Konzentrationen stärker sein als bei den schwächeren, was auch tatsächlich immer der Fall war.

Dasselbe tritt auch ein, wenn man die Reaktionsgeschwindigkeit nicht durch Erhöhung der Temperatur, sondern durch Zusatz des Katalysators, der Kalilauge erhöht. Doch ist dies allerdings nur dann für einen katalytischen Vorgang beweisend, wenn es sich um ganz geringe Mengen des Katalysators handelt, die bei der Bildung des Produktes der wirkenden Massen vernachlässigt werden können, da bei großen Mengen der Kalilauge, auch wenn es sich nicht um einen katalytischen Vorgang handelt, das Guldberg-Waagesche Gesetz seine Gültigkeit hat.

Es wird also durch Zusatz der Kalilauge die Dextrose katalytisch in Lävulose verwandelt, aus der dann beim Anstellen der Seliwanoffschen Probe sekundär, doch jetzt in größerer Menge, das wirkende Oxymethylfurfurol entsteht.

Wie schon Rothmund<sup>2)</sup> nachgewiesen hat, hat der Druck zwischen 1 und 80 Atm. auf die Reaktionsgeschwindigkeit in Flüssigkeiten keinen merklichen Einfluß, weshalb ich auf Untersuchungen dieser Art verzichtete.

Ebenso wie die OH-Ionen der Basen wirken auch die H-Ionen der Säuren beschleunigend auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei einem katalytischen Prozeß ein. Es muß also auch gelingen, durch Zusatz von Säuren zu Dextroslösungen eine Invertierung hervorzurufen.

Schon Rosin<sup>3)</sup> hat, wie bereits oben erwähnt, durch Erhitzen mit Salzsäure und Ost<sup>4)</sup> durch längere Einwirkung von Schwefelsäure aus Dextrose Lävulose sich bilden gesehen.

Ich untersuchte das nun systematisch durch einfaches Zusetzen von Säure ohne gleichzeitiges Erhitzen und benutzte ebenfalls Salzsäure, einmal, um daraus dann die Anwendung

---

<sup>1)</sup> Guldberg und Waage, Journ. f. prakt. Chem., N. F. 19, 69, 1879.

<sup>2)</sup> Rothmund, Zeitschr. f. physikal. Chem. 20, 168, 1896.

<sup>3)</sup> Rosin, Beiträge z. wissenschaftl. Med. u. Chem. Festschrift für E. Salkowski, Berlin 1904.

<sup>4)</sup> Ost, Zeitschr. f. angew. Chem. 1905, II, S. 1170.



für die Seliwanoffsche Probe zu ziehen, und dann auch, weil Salzsäure nächst der Salpetersäure nach Thomsen den größten Affinitätskoeffizienten hat, d. h. nach den Untersuchungen von Ostwald auch bei solchen Reaktionen am stärksten wirkt, die unter dem Einfluß von Säure katalytisch beschleunigt werden. Auch nach den Untersuchungen von Arrhenius ist die katalytische Wirkung der Säuren von ihrer Stärke abhängig, wobei unter „Stärke der Säure“ die Menge der H-Ionen zu verstehen ist, die in einem bestimmten Volumen enthalten sind.

#### 6. Versuch.

Zu je 5 ccm der verschiedenen Dextroselösungen setzte ich je 1, resp. 2 ccm  $\frac{1}{10}$ , resp.  $\frac{1}{4}$ -HCl. Nach 24 Stunden wurden die Mischungen durch entsprechenden Zusatz von  $\frac{1}{10}$ , resp.  $\frac{1}{4}$ -KOH neutralisiert und dann die Lävuloseproben angestellt. Der Ausfall ergab keinen Unterschied gegenüber den nicht vorbehandelten Kontrolllösungen.

Das spricht aber nicht gegen einen katalytischen Vorgang. Denn die zugesetzten Mengen der Salzsäure, also der H-Ionen, waren sehr gering und nach den Untersuchungen von Bredig<sup>1)</sup>, Bredig und Intosh<sup>2)</sup> und Marck<sup>3)</sup> muß die zugesetzte Menge des Katalysators erst einen bestimmten Schwellenwert erreicht haben, ehe die Katalyse beginnt.

Ich wiederholte daher diesen Versuch mit Zusatz von größeren Mengen Salzsäure.

#### 7. Versuch.

Je 5 ccm der Dextroselösungen wurden versetzt mit:

1. 1 ccm 25%iger HCl,
2. 3 ccm 25%iger HCl,
3. 5 ccm 25%iger HCl.

Nach 4 Tagen wurden Reihe 1 und 2 auf 5 ccm HCl aufgefüllt und mit allen Mischungen die Lävuloseprobe angestellt. Zur Kontrolle dienten Proben, zu denen erst kurz vor Anstellung der Reaktion die Salzsäure zugesetzt wurde.

Hier ergab sich eine Umwandlung, d. h. eine positive Lävuloseprobe und ein deutlicher Unterschied gegenüber den Kontrollproben. Außerdem waren die Proben der 3. Reihe stärker positiv als die der 2. und 1., und die der 2. stärker als die der 1. Reihe.

<sup>1)</sup> Bredig, diese Zeitschr. 6, 283, 1907.

<sup>2)</sup> Bredig und Intosh, Journ. of physio. Chem. 6, 15, 1902.

<sup>3)</sup> Marck, Katalyse des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch kolloidales Mangandioxyd. Diss. Heidelberg 1907.

Also auch hier war mit größerer Konzentration der katalytisch wirkenden Ionen der Einfluß auf die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit größer. Ebenso war bei den Dextroslösungen stärkerer Konzentration der Ausfall stärker als bei den geringeren Konzentrationen.

So kommt außer der Bildung des  $\omega$ -Oxymethylfurfurols aus Dextrose durch Einwirkung der Säuren auch eine katalytische Umwandlung der Glucose in Fructose dazu, aus der dann erst sekundär der bei der Seliwanoffschen Probe wirkende Körper entsteht.

Die Ergebnisse der vorstehenden Untersuchungen tragen also dazu bei, die Forderungen bestimmter Kautelen bei Anstellung der Seliwanoffschen Probe — Dextrose nicht über 2%, Salzsäure nicht über 12,5%, Erhitzen nicht länger als 20 bis 30 Sekunden — zu erklären, da bei Nichtbeachtung derselben ein Übergang von Dextrose in Lävulose eintritt und so auch reine Dextroslösungen eine positive Seliwanoffsche Reaktion geben.

# Über den Zustand des Chlorophylls in der Pflanze und über kolloidales Chlorophyll

Von

Amedeo Herlitzka.

(Aus dem physiologischen Institut in Turin.)

(Eingegangen am 13. Dezember 1911.)

Nach den Untersuchungen von Hagenbach<sup>1)</sup> sind sämtliche Absorptionsstreifen im Spektrum des lebenden Blattes im Vergleich zu demjenigen einer Chlorophylllösung nach dem langwelligeren Ende des Spektrums hin verschoben. Tschirch<sup>2)</sup> hatte die Vermutung ausgesprochen, daß diese Erscheinung der Gegenwart von Körpern mit hohem Dispersionsvermögen zuzuschreiben sei: da ja solche Körper, wenn sie mit einer Farblösung vermischt werden, die der Lösung eigene Absorptionsstreifen nach dem Rot hin verschieben (Kundt). Doch daraufhin gerichtete Versuche (Zusatz von Anisöl oder Schwefelkohlenstoff zur Chlorophylllösung) führten zu keinem positiven Erfolg. Dieser blieb aber nicht aus, als Tschirch zur Chlorophylllösung eine Gelatinelösung hinzufügte; daraus folgerte Tschirch, daß die Verschiebung der Absorptionsstreifen des Chlorophylls in den Blättern sowohl dem Dispersionsvermögen als auch dem spezifischen Gewichte des mit dem Chlorophyll im Blatte vermischten Körpers zuzuschreiben sei.

In einem Vortrag, den ich vor einem Jahre über „Chlorophyll und Hämoglobin“<sup>3)</sup> gehalten habe, habe ich darauf aufmerksam gemacht, daß die oben referierten Ergebnisse Tschirchs

<sup>1)</sup> Hagenbach, Poggend. Ann. 1870, 141.

<sup>2)</sup> Tschirch, Untersuchungen über das Chlorophyll. Berlin 1884, S. 25.

<sup>3)</sup> A. Herlitzka, Clorofilla ed Emoglobina. Atti Soc. Ital. Progr. Scienze. IV. Riunione di Napoli 1910, S. 437.

heutzutage anders gedeutet werden können, und zwar im Sinne, daß der Zusatz von einer Gelatinelösung zur Chlorophylllösung letztere in eine kolloidale Lösung verwandelt, und daß im kolloidalen Zustande des Chlorophylls die Ursache zu der Änderung des Absorptionsspektrums zu suchen ist. Willstätter<sup>1)</sup> hat nämlich gezeigt, wie man aus einer alkoholischen oder acetonischen Chlorophylllösung durch Wasserzusatz eine kolloidale Lösung erhalten kann.

Zweck vorliegender Untersuchungen ist die experimentelle Nachprüfung obiger Annahme; es war aber bei derselben notwendig, das kolloidale Chlorophyll einem eingehenderen Studium zu unterwerfen, da die Kenntnisse, die wir darüber besitzen, äußerst spärlich sind und sich darauf beschränken, was darüber Willstätter berichtet hat. Dieser Forscher hatte aber nur den Zweck im Auge, eine Methode zur Reinigung des Chlorophylls auszuarbeiten. Was aus seiner Mitteilung hervorgeht, ist folgendes: „Lösungen von Chlorophyll und ähnlich von einigen Chlorophyllderivaten in Alkoholen oder Aceton geben (entgegen den Angaben der Literatur) beim Versetzen mit viel Wasser keine Ausscheidung, sondern mattgrüne, fluoreszierende, kolloidale Lösungen. Diese geben an Äther kein oder fast kein Chlorophyll ab. Beim Aussalzen und Ausäthern erhält man das Chlorophyll.“ Zum Aussalzen wurde eine Chlorocalciumlösung verwandt.

Um der mich beschäftigenden Frage näher zu treten, habe ich vor allem getrachtet, das Chlorophyll aus der Pflanze in physikalischer Hinsicht in möglichst wenig verändertem Zustande zu erhalten, was jedenfalls am ehesten durch die Buchnersche Presse zu erreichen ist. Den so erhaltenen Preßsaft habe ich auf seine Eigenschaften, sei es mit dem nach Willstätter hergestellten kolloidalen Chlorophyll, sei es mit den gewöhnlichen alkoholischen bzw. acetonischen oder ähnlichen Chlorophylllösungen verglichen. Sämtliche Chlorophyllpräparate stammten aus Spinat.

1. Bereitung des Preßsaftes. Wenn man die Blätter mit Quarzsand und Kieselgur (nach der gewöhnlichen Buchnerschen Methode) verreibt, so nimmt der Preßsaft eine dunkelbraune Farbe an und enthält kein Chlorophyll; der Blätterkuchen bleibt dagegen intensiv grün gefärbt und das Chlorophyll

<sup>1)</sup> R. Willstätter, Liebigs Ann. 350, 70, 1906.

ist leicht und in guter Ausbeute daraus zu bekommen. Wenn aber beim Verreiben der Blätter nur Quarzsand angewandt wird, so färbt sich der Preßsaft intensiv grün und enthält anscheinend den größten Teil des Chlorophylls aus den Blättern.

Die Chlorophylllösung wurde aus dem mit Quarzsand und Kieselgur erhaltenen Blätterkuchen bereitet. Letzterer war bei 350 kg per Quadratcentimeter ausgepreßt und dann bis zur Trockne an der Luft gelassen und zu Pulver verrieben; daraus wurde das Carotin mit Benzin in der Kälte extrahiert; aus dem nochmals an der Luft getrockneten Pulver wurde das Chlorophyll durch wiederholtes Aufgießen von 95%igem Alkohol extrahiert. Die alkoholischen Auszüge wurden mit Wasser bis zu einem Gehalt an Alkohol von 80% verdünnt, und das Chlorophyll wurde daraus durch Schwefelkohlenstoff im Scheidetrichter extrahiert. Bei gelinder Wärme über einer elektrischen Birne zur Trockne verdampft, wurde das Chlorophyll wieder in Alkohol gelöst und aus diesem unter Wasserzusatz in Äther aufgenommen; durch Stehenlassen an der Luft wieder getrocknet, wurde nun das Chlorophyll zur Lösung in Alkohol oder in Aceton verwandt.

3. Das kolloidale Chlorophyll wurde durch Zusatz von destilliertem Wasser zu der Acetonlösung bereitet. Das Aceton wurde dann durch einen Luftstrom in der Kälte oder durch Erwärmen auf dem Wasserbad entfernt (s. darüber weiter unten).

Verhalten des Preßsaftes. Der Preßsaft aus Spinat (ohne Kieselgur) ist eine dunkelgrüne, undurchsichtige Flüssigkeit, die deutlich alkalisch reagiert. Durch eine 4 Stunden lange Zentrifugation erhält man einen spärlichen weißen Niederschlag (Quarzsand), während die grüne Flüssigkeit makroskopisch homogen erscheint. Mikroskopisch untersucht findet man weder in der Flüssigkeit noch im Niederschlag geformte Bestandteile. Durch Filtrierpapier geht die Flüssigkeit unverändert durch.

Bei Filtration durch Kollodionfilter nach Bechhold (Filter mittels 5%iger Eisessig-Kollodionlösung bereitet; Druck 2 Atm.) geht eine dunkelbraune Flüssigkeit durch; auf dem Filter bleibt 1. ein schwarzer Niederschlag, der direkt auf dem Filter haftet, 2. über diesem eine dunkelgrüne schmierige Masse, die im Wasser aufgeschwemmt werden kann.

Wenn der Preßsaft der Dialyse gegen fließendes Wasser unterworfen wird (Faltenfilter zur Dialyse von Schleicher und Schüll, Nr. 522), so geht der grüne Farbstoff nicht durch die Membran; wenn nun die Flüssigkeit nach mehrere Tage langer Dialyse der Ultrafiltration (wie oben) unterworfen wird, so ist das Ultrafiltrat eine helle, citronengelbe bis farblose neutrale Flüssigkeit; auf dem Filter bleibt wieder eine schmierige grüne Masse. Ich muß aber hier noch bemerken, daß in einzelnen Fällen durch die fortgesetzte Dialyse (z. B. nach 8 Tagen) sich im Preßsaft ein grüner Niederschlag bildet, während darüber eine gelblich gefärbte oder farblose Flüssigkeit bleibt. In den meisten Fällen behält aber der Preßsaft bei der Dialyse ein unverändertes Aussehen.

Wenn der Preßsaft mit Äther ausgeschüttelt wird, so nimmt letzterer kein Chlorophyll auf, was schon Willstätter für das kolloidale Chlorophyll angegeben hat.

Wenn der Preßsaft — sei es der dialysierte, sei es der undialysierte — zum Sieden erhitzt wird, so färbt sich das Gerinnsel tiefgrün, während die Flüssigkeit ziemlich hellgrün bleibt. Aus dem Gerinnsel kann man leicht das Chlorophyll ausäthern. Der Preßsaft weist einige fermentative Eigenschaften auf, und zwar bewirkt derselbe starke Zersetzung des Wasserstoffsperoxyds (Katalase), Bläuung der Guajakharzlösung, sowohl bei Gegenwart von Peroxyden (Peroxydase), als auch ohne dieselben (Oxydase).

Wenn der Preßsaft nach 4tägiger Dialyse der Kataphorese unterworfen wird (Technik nach Bottazzi<sup>1)</sup>), so wandert der grüne Farbstoff zur Anode hin.

Was die optischen Eigenschaften des Farbstoffs betrifft, so möchte ich mich darauf beschränken (auf das Absorptionsspektrum komme ich weiter unten), folgendes zu bemerken: Im Preßsaft ist nie die für die Chlorophylllösungen so charakteristische rote Fluoreszenz zu sehen; sowohl bei auffallendem wie bei durchgehendem Lichte ist die Farbe immer grün, obwohl bei ersterem der Farbenton mehr ins Gelbliche sticht als bei letzterem. Es ist kaum der Mühe wert zu erwähnen, daß bei der ultramikroskopischen Beobachtung der Preßsaft

<sup>1)</sup> F. Bottazzi, Rend. Acc. Lincei 18, 5, 487, 1909. Vorrichtung nach Fig. 2.

eine große Zahl verschiedenartiger Granula aufweist; deshalb ist auch diese Beobachtung nichtssagend, doch möchte ich hervorheben, daß man dabei keine rotgefärbten Körnchen oder Kegel zu Gesicht bekommt, während Raehlmann<sup>1)</sup> bei der sogenannten „Chlorophylli puri solutio aquosa“ von Merck einen „intensiven roten Staubkegel“ gesehen hat.

Das Verhalten des kolloidalen Chlorophylls. Dieses stellt eine grüne Flüssigkeit dar, die bei langem Stehen gewöhnlich keinen Satz bildet; unter Umständen scheidet sich aber ein Teil des Chlorophylls ab, besonders aber, wenn man die Lösung zur Siedehitze erwärmt und ein Teil des Wassers verdampfen läßt, Doch ist diese Ausscheidung nur eine beschränkte.

Wie der Preßsaft, so weist auch das kolloidale Chlorophyll die rote Fluorescenz nicht auf. Ich habe diesen Umstand benützt, um den Umschlag von der alkoholischen (resp. acetonschen) zur kolloidalen Lösung zu beobachten. Besonders wenn man eine Chlorophylllösung in den Lichtkegel einer starken Projektionslampe bringt, so sieht man die Lösung bei auffallendem Lichte feurig blutrot; wenn man nun zur Lösung dest. Wasser zufügt, so nimmt die rote Farbe immer mehr ab, während die grüne Farbe zum Vorschein kommt. Zuletzt verschwindet die rote Farbe gänzlich.

Ich habe nun zu bestimmen versucht, wieviel Wasser zugesetzt werden muß, damit man das Ende des Umschlages, der ziemlich deutlich ist, erhält; der Anfang des Umschlages von rot in grün ist viel schwieriger zu bestimmen.

Ich habe die Bestimmung an zwei acetonschen Chlorophyllösungen ausgeführt; die Lösung B war aus der Lösung A durch Verdünnen mit einem gleichen Volumen Aceton erhalten worden.

Zu 100 ccm der Lösung A müssen 44 ccm dest. Wasser zugesetzt werden, um den Umschlag zu erreichen, zu 100 ccm der Lösung B 54 ccm Wasser<sup>2)</sup>; bei der Lösung B ist der Umschlag weniger deutlich. Um also eine konzentrierte Chlorophylllösung in kolloidales Chlorophyll zu verwandeln, gehört

---

<sup>1)</sup> Arch. f. d. ges. Physiol. 112, 141, 1906.

<sup>2)</sup> Übereinstimmendes Resultat von je 5 Bestimmungen.

eine kleinere Menge Wasser, als um eine verdünntere Lösung kolloidal werden zu lassen.

Was die Eigenschaften des kolloidalen Chlorophylls betrifft, so will ich gleich hervorheben, daß dieselben denjenigen des Chlorophylls im Preßsaft entsprechen. Daß aus demselben wie aus der kolloidalen Lösung das Chlorophyll nicht ausgeäthert werden kann, habe ich schon hervorgehoben.

Die kolloidale Chlorophylllösung weist Katalase- und Peroxydase-, aber keine Oxydasewirkung auf. Ob diese Wirkungen dem Chlorophyll selbst oder den in der Lösung enthaltenen Verunreinigungen zuzuschreiben sind, wollen wir dahingestellt sein lassen.

Wie im Preßsaft, so wird das Chlorophyll auch in der kolloidalen Lösung während der Kataphorese zur positiven Elektrode übergeführt.

Daß das Chlorophyll ein elektronegatives Kolloid darstellt, ist auch daraus zu ersehen, daß es durch kolloidales Eisenhydrat in verdünnter Lösung, nicht aber durch kolloidales Arsentrisulfid niedergeschlagen wird.

Ausgesalzen wird das kolloidale Chlorophyll außer durch Calciumchlorid (Willstätter) auch durch verdünnte Bariumchloridlösung, sowie durch Magnesium- oder Ammoniumsulfatlösung. Für letztere habe ich die Konzentrationsgrenze, die noch einen Niederschlag hervorruft, bestimmt.

1.  $\frac{1}{10}$  gesättigte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung 2,5 ccm, kolloidale Chlorophylllösung 97,5 ccm, kein Niederschlag;

2.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung 5,0 ccm, Chlorophylllösung 95,0 ccm, spärlicher Niederschlag;

3.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung 10,0 ccm, Chlorophylllösung 90,0 ccm, unvollständiger Niederschlag;

4.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung 20 ccm, Chlorophylllösung 80,0 ccm, unvollständiger Niederschlag;

5.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung 25,0 ccm, Chlorophylllösung 75,0 ccm, vollständiger Niederschlag.

Durch Kaolin wird aus der kolloidalen Lösung das Chlorophyll nicht ausgeschieden.

Was die Ultrafiltration betrifft, so habe ich dieselbe mit  $\frac{5}{10}$  igem Eisessigkollodionfilter unter 2 Atm. Druck ausgeführt.



Von der kolloidalen Chlorophylllösung geht nur das Lösungsmittel durch, und zwar sehr rasch: so z. B. waren in einem Versuch nach 15 Minuten 50 ccm einer farblosen, vollkommen klaren Flüssigkeit filtriert. Auf dem Filter bleibt ein dunkelgrüner trockener Überzug, der, abgeschabt und ins Wasser gebracht, keinerlei Lösung gibt; in Alkohol ist der Überzug vollkommen lösbar.

Ultramikroskopisch untersucht, sieht man im kolloidalen Chlorophyll keinen roten Lichtkegel, dagegen eine Unzahl sich lebhaft bewegender Körner: mit dem Paraboloid-Kondensor untersucht, erscheinen die Körnchen gelblich, in der Quarzcuvette des Siedentopfschen Ultramikroskops betrachtet, sind die Körnchen weiß und äußerst leuchtend.

Verhalten der Chlorophylllösung. Ich habe bei der Lösung des Chlorophylls in Aceton und in Alkohol das Verhalten bei der Ultrafiltration untersucht. Wenn die Ultrafiltration mittels eines 5%igen Eisessigkollodionfilters nach Auswaschen desselben mit Alkohol ausgeführt wird, so tritt die Lösung unverändert durch das Filter, und auf demselben bleibt kein Niederschlag<sup>1)</sup>. Bei der ultramikroskopischen Untersuchung zeigt die Lösung bei Dunkelfeldbeleuchtung keine oder nur vereinzelte, sich nicht bewegende Körnchen, sonst aber keinerlei besondere Erscheinung; bei seitlicher Beleuchtung in der Quarzcuvette des Siedentopfschen Apparates sieht man einen blutroten Lichtkegel, in dem man — auch bei großer Verdünnung — einzelne Körnchen nicht unterscheiden kann. Wohl kommen manchmal größere weiße Körner vor, doch sind diese sehr spärlich und Verunreinigungen zuzuschreiben. Wenn man die Chlorophylllösung in der Quarzcuvette mit Wasser vermischt, so sieht man den roten Kegel verschwinden, während ein heller stark leuchtender Kegel erscheint, in dem unzählige weiße Körner erscheinen. Im Augenblick der Vermischung sieht man im Lichtkegel weiße und rote Streifen, bis endlich letztere vollständig verschwinden.

---

<sup>1)</sup> Bechhold (diese Zeitschr. 6, 394, 1907) gibt an, daß von einer Rohchlorophylllösung (enthaltend Fette und Wachse) bei der Ultrafiltration durch 10%igen Eisessigkollodionfilter nur das Lösungsmittel, nicht aber das Chlorophyll durchgeht. Ich habe diesen Umstand nicht weiter verfolgt.

Spektroskopische Untersuchung. Wir wenden uns nun zu der spektroskopischen Untersuchung der verschiedenen chlorophyllhaltigen Lösungen. Ich habe sowohl die Lage des I., II. und III. Absorptionsstreifen bei dem lebenden Blatte, als auch bei der Aceton- und Alkohol-Chlorophylllösung, bei dem Preßsaft und bei den kolloidalen Lösungen, die aus den Aceton- resp. Alkohollösungen nur durch die Einwirkung des Wassers hergestellt worden waren, bestimmt.

In folgender Tabelle sind die Werte der Wellenlänge der absorbierten Strahlen enthalten; und zwar entsprechen in jeder Stelle die zwei ersten Zahlen den Grenzwerten, die dritte Zahl dem Mittelwert. Die Messungen wurden mittels eines Krüßschen Spektrophotometers ausgeführt.

Streifen	Alkoholische Lösung I	Alkoholische Lösung II <sup>1)</sup>	Acetonische Lösung	Kolloidale Lösg. aus Lösung I	Kolloid. Lösg. aus Acetonlösung	Preßsaft	Lebendiges Blatt
I	674—639 656,5	667—653 660	690—634 662	693—659 676	698—659 674	692—659 675,5	692—659 675,5
II	617—602 609,5	?	612—602 607	627—605 616	624—607 615,5	624—605 614,5	619—612 615,5
III	544—530 537	541—534 537,5	541—528 534,5	551—536 543,5	552—538 545	552—537 545,5	552—542 547

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß sämtliche Streifen der kolloidalen Lösungen, des Preßsaftes und des Blattes nach dem langwelligen Ende des Spektrums hin im Vergleich zu der acetonischen und zu der alkoholischen Lösung verschoben sind. Das ist sehr prägnant zu sehen, wenn man eine alkoholische und eine kolloidale Lösung übereinander vor dem Collimator des Spektroskopes bringt; dann sieht man, daß die Streifen in der oberen und in der unteren Hälfte des Spektrums eine verschiedene Lage haben. Wir sehen auch, daß die Werte für die kolloidale Lösung und diejenige des Preßsaftes und des Blattes gut miteinander übereinstimmen. Hier ist hervorzuheben, daß die Verschiebung der Absorptionsstreifen bei dem kolloidalen Chlorophyll durch keinerlei Zusatz von fremden Stoffen — außer Wasser — bedingt ist.

<sup>1)</sup> Aus Lösung I durch Verdünnen mit gleichem Volum Alkohol hergestellt; Streifen II ist nicht mit Sicherheit zu erkennen.

Wenn wir nun die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammenfassen, so können wir behaupten, daß damit bewiesen worden ist,

1. daß im Preßsaft das Chlorophyll in einem anderen Zustande enthalten ist, als in den gewöhnlichen Lösungen in organischen Lösungsmitteln;

2. daß dieser Zustand derselbe ist wie in der kolloidalen Chlorophylllösung;

3. daß diese kolloidale Chlorophylllösung ein Dispersoid darstellt, während es noch fraglich ist, ob dasselbe für die alkoholische, resp. acetonische Lösung gilt;

4. daß das kolloidale Chlorophyll ein elektronegatives Kolloid ist, das nicht sehr beständig ist und leicht ausgeflockt werden kann;

5. daß der Unterschied zwischen dem Spektrum der (alkoholischen usw.) Chlorophyllösungen und demjenigen des Blattes, resp. des Preßsaftes, in dem Umstande zu suchen ist, daß in letzteren das Chlorophyll im kolloidalen Zustande sich befindet.

Ich möchte darauf hinweisen, daß damit noch nicht auf die Identität des Zustandes des Chlorophylls im Blatte und in der kolloidalen Lösung geschlossen werden kann. Ich erinnere hier an die Ausführungen von Bottazzi<sup>1)</sup> über kolloidale und disperse Systeme und auf seine Behauptung eines tiefgreifenden Unterschiedes zwischen den beiden Zuständen. Nach Bottazzi wäre eine kolloidale Lösung eine wirkliche Lösung und kein disperses System, und die lebenden Zellen wären, wie die echten Kolloide, homogene Lösungen, während bei Zerstörung der Zelle durch chemische, osmotische u. ä. Einwirkungen sich das Kolloid in ein disperses System (durch Rückgang der Dissociation u. ä.) umwandeln kann.

In diesem Sinne ist das kolloidale Chlorophyll kein echtes Kolloid, sondern ein Dispersoid. Jedenfalls ist es nicht möglich zu sagen, ob das Chlorophyll in der lebenden Zelle sich in einer optisch homogenen Lösung (Kolloid im Sinne Bottazzis) befindet oder nicht, und ob die Auspressung und die damit verbundene Einwirkung des Zellsaftes auf das Chlorophyll eine Veränderung des Zustandes im letzteren hervorruft.

<sup>1)</sup> F. Bottazzi, Soc. Ital. Progr. Scienze, IV. Riunione Napoli 1910, S. 353.

Immerhin geht aus der spektroskopischen Untersuchung hervor, daß das Chlorophyll im lebenden Blatte eher im Zustande der kolloidalen (dispersen) Lösung als in einem demjenigen der alkoholischen Lösung ähnlichen Zustande sich befindet.

Ob der physikalisch-chemische Zustand des Chlorophylls eine wichtige Rolle für seine biochemische Aufgabe spielt, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zum Schlusse sei noch darauf hingewiesen, daß es noch erübrigt zu untersuchen, ob die von mir hier mitgeteilten Ergebnisse beide Chlorophyllarten, die krystallisierte und die amorphe, betreffen.

---

# Über formoltitrimetrische Untersuchungen an Eiweißkörpern.

## I. Mitteilung.

Von

Friedrich Obermayer und Robert Willheim.

(Aus dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt  
Rudolfstiftung, Wien.)

*(Eingegangen am 18. Dezember 1911.)*

### Methodischer Teil.

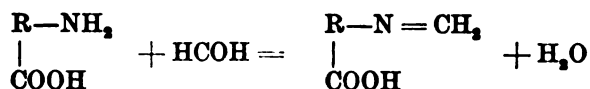
Im Verlaufe von Enzymstudien, die wir unter Zuhilfenahme der Formoltitration von Sørensen anstellten, führten uns gewisse Versuchsergebnisse zu der Annahme, daß das Eiweiß als solches formoltitrierbar sei, d. h. daß seine Reaktion nach Zusatz von neutralem Formaldehyd sich nach der sauren Seite hin verschiebe. Dieses Verhalten ist im allgemeinen für Aminosäuren und Ammoniak charakteristisch und von Ronchese, Sørensen, Malfatti und nach ihnen einer Anzahl anderer Autoren zur quantitativen Bestimmung der ersteren, in manchen Fällen auch des Ammoniaks, verwendet worden. Es war daher zuerst zu untersuchen, ob auch Eiweiß, das von Aminosäuren und Ammoniak vollkommen frei ist, gegen Formaldehyd das geschilderte Verhalten zeigt.

Zu diesem Zwecke wurden Eiweißkörper verschiedenster Herkunft zuvörderst durch mehrtägige Dialyse gereinigt. Hierauf überzeugten wir uns durch das Verhalten des Untersuchungsobjekts gegenüber dem Neßlerschen Reagens von dem Fehlen des Ammoniaks, durch das Verhalten gegenüber der Chinonprobe, die lediglich einen braunen Farbenton, nie jedoch einen violetten lieferte, von dem Fehlen der Aminosäuren. Auch war bei der Untersuchung koagulabler Eiweißkörper nach er-

folgte Gerinnung und Absaugung, sowie sorgfältiger Waschung des Koagulates in dem mit den Waschwässern vereinigten und eingengten Filtrate, formoltitrierbare Substanz entweder gar nicht oder nur in alleräußersten Spuren nachweisbar. Die wässrige Lösung des auf Lackmus neutral reagierenden Eiweißkörpers jedoch zeigte nach dem Versetzen mit neutralisiertem Formaldehyd das Auftreten einer stark sauren Reaktion. Durch diese Versuche haben wir den exakten Beweis dafür erbracht, daß das Eiweiß als solches formoltitrierbar ist und diese Eigenschaft nicht etwa ihm anhaftenden Aminosäuren oder Ammoniak verdankt.

Wir waren bereits zu dieser Feststellung gelangt, als wir bei der Durchsicht der einschlägigen Literatur fanden, daß H. Schiff<sup>1)</sup> bereits vor Jahren die Formoltitrierbarkeit des Eiweißes behauptet hatte. Allerdings hat der genannte Autor die von uns beobachteten Kautelen (Beweis der Abwesenheit von Ammoniak und Aminosäuren) nicht durchgeführt, ja sich anscheinend nicht einmal dialysierten Eiweißes bedient, so daß seinen Ergebnissen nicht die gleiche Eindeutigkeit wie den unseren zukommt.

Es erhebt sich nunmehr die Frage nach der chemischen Konstitution der Körper, die bei der Einwirkung des Formaldehyds auf Eiweiß entstehen und nach der Ursache der hierbei auftretenden Aciditätszunahme. Bei der Reaktion zwischen Formalin und Aminosäuren kommt es, wie in der Literatur vielfach ausgeführt wird<sup>2)</sup>, nach folgender Gleichung



zur Bildung einer Methylenverbindung der Aminosäuren, ein Prozeß, durch den die Aminogruppe ihres Einflusses auf die Reaktion der Verbindung beraubt wird. Beim Eiweiß scheinen nun die Verhältnisse komplizierter zu liegen, denn die Zahl der Möglichkeiten, nach denen Proteinstoffe und Formalin miteinander reagieren können, ist eine große.

<sup>1)</sup> Liebigs Ann. 319, 1901.

<sup>2)</sup> Am eingehendsten von Sörensen: Diese Zeitschr. 7. Enzymstudien.

Blum<sup>1)</sup>, der sich wohl zuerst mit dem Studium derartiger Reaktionsprodukte abgegeben hat, hält vorzüglich die Aminogruppen und Hydroxylgruppen des Eiweißes für geeignete Anlagerungspunkte des Formalins.

Leo Schwarz<sup>2)</sup>, dem wir gleichfalls eine Monographie über diesen Gegenstand verdanken, zieht auch bestimmte Fälle anders gebundenen Stickstoffs, ferner gewisse Kohlenstoffatome, sowie die SH-Gruppe in den Kreis der Möglichkeiten.

Unter allen diesen Annahmen schien uns jedoch bloß die Anlagerung des Formalins an freie Aminogruppen und die damit verbundene Bildung von Methylenverbindungen eine wesentliche Zunahme der Acidität hervorrufen zu können.

Zur Klärung dieser Frage war es notwendig, die endständigen  $\text{NH}_2$ -Gruppen auf einem anderen Wege zu entfernen und auf das so erhaltene Produkt Formalin einwirken zu lassen. War unsere oben angegebene Vermutung richtig, durfte jetzt keine Zunahme der Acidität erfolgen. Als Desamidierungsverfahren wurde die Behandlung mit  $\text{NaNO}_2$  und Essigsäure gewählt, wie sie von Schiff<sup>3)</sup> zum ersten Male am Eiweiß vorgenommen wurde. Im Interesse einer möglichst vollständigen Entfernung der endständigen  $\text{NH}_2$ -Gruppen haben wir jedoch nicht wie Schiff bei  $40^\circ$ , sondern bei  $90^\circ$  gearbeitet. Eine eventuelle Hydrolyse hatten wir nicht zu fürchten, da hierbei frei gewordene  $\text{NH}_2$ -Gruppen durch die überschüssige salpetrige Säure wohl gleich entfernt worden wären. Das Resultat entsprach unseren Erwartungen: Formalin machte hier im Gegensatz zu seinem Verhalten gegenüber nativem Eiweiß keine praktisch in Betracht kommende Aciditätszunahme.

Wir sind daher berechtigt, den Grad dieser Aciditätszunahme ganz so wie bei den einfachen Aminosäuren mit der Zahl der vorhandenen freien Aminogruppen in Relation zu bringen, unbekümmert darum, ob sich das Formaldehyd außerdem noch an andere Gruppen des Eiweißmoleküls angelagert hat oder nicht. Und damit wären wir bei der Möglichkeit angelangt, die Zahl der in einer bestimmten Eiweißmenge vorhandenen freien Aminogruppen titrimetrisch zu bestimmen.

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 127.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 460.

<sup>3)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 29, 2, 1354.

Die Grundzüge einer derartigen Titration liegen übrigens bereits in der früher zitierten Arbeit von H. Schiff vor.

Bevor wir zur Schilderung der von uns befolgten Methodik übergehen, ist es angezeigt, noch auf folgendes Moment theoretischer Natur hinzuweisen. Die Bestimmung der Aminogruppen in Aminosäuren mit Hilfe der Formoltitration ist eigentlich eine indirekte Methode, denn es werden hier lediglich die vor der Formalinzugabe von den Aminogruppen gedeckten sauren Gruppen titriert und aus der so ermittelten Zahl der letzteren die Menge der ersteren erschlossen. Aus dieser Betrachtung könnte vielleicht geschlossen werden, daß bei Vorhandensein von Polyaminosäuren unbekannter Konstitution — die Eiweißkörper sind solche — die Methode nur dann einwandfreie Werte liefern kann, wenn die Anzahl der im Molekül vorhandenen freien Aminogruppen der der sauren Gruppe höchstens gleichkommt.

Dem ist jedoch nicht so. Denn die zu titrierenden Lösungen werden ja vor der Untersuchung neutralisiert und hierbei eventuell vorhandene, durch COOH-Gruppen nicht gedeckte Aminogruppen nunmehr durch die zur Neutralisation verwendete Säure gedeckt. Diese zur Neutralisation verwendete Säure (etwa HCl) ist es auch, die nach der Formalinzugabe neben den im Eiweißmolekül vorhandenen Carboxylgruppen ihren Säurecharakter wieder geltend macht. Unseres Erachtens wird daher dadurch, daß hier  $\text{NH}_2$ -Gruppen reichlicher vorhanden sind als freie COOH-Gruppen, die Genauigkeit in der Bestimmung nicht beeinträchtigt.

Was die von mehreren Autoren im Eiweißmolekül angenommenen endständigen CO— $\text{NH}_2$ -Gruppen anbelangt, so glauben wir diesen eine Rolle bei der Formoltitration absprechen zu dürfen, denn die entsprechenden von Sørensen ausgeführten grundlegenden Untersuchungen lehren, daß der Amidostickstoff in den untersuchten Säureamiden (Harnstoff, Glutamin, Asparagin) in keiner Weise das Titrationsresultat beeinflusst. Auch haben wir diese Untersuchungen mit unserer etwas abgeänderten Methode nachgeprüft und konnten sie völlig bestätigen.

Die von uns befolgte Versuchsmethodik schließt sich im allgemeinen an die von Sørensen gegebenen Vorschriften an. Selbstverständlich erforderte jedoch die Eigenart des Untersuchungsmaterials gewisse Abänderungen.



Der zu untersuchende Eiweißkörper wurde zuerst aus dem Ausgangsmaterial (Serum, Eiereiweiß, Verdauungsgemisch usw.) mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfataussalzung, in manchen Fällen auch durch Magnesiumsulfat oder Kochsalz isoliert und nach mehrfachem Umfällen der Dialyse in strömendem Wasser überlassen. Bei der Ammoniumsulfat-Fällung ist diese Dialyse selbstverständlich eine *conditio sine qua non*, da vorhandene Ammoniaksalze bei der Formoltitrierung mitbestimmt würden. Bei Kochsalzaussalzungen, wie wir sie bisweilen bei der Isolierung von Verdauungsprodukten verwendeten, entfällt allerdings dieses Moment. Aber die Erfahrung, daß manche Eiweißkörper in konzentrierten Kochsalzlösungen nach Formalinzusatz leicht Fällungen geben, worauf schon L. Schwarz hingewiesen hat, weiterhin die Tatsache, daß die Schärfe im Umschlag des Indicators in diesem Medium ungünstig beeinflusst wird, ließen uns auch hier eine Dialyse ratsam erscheinen. Bei der Titration selbst nun machte uns die Beschaffung einer brauchbaren Kontrollflüssigkeit Schwierigkeiten. Sörensen bedient sich hierzu des Wassers, dem er gegebenenfalls durch Zusatz von Farbstofflösungen ein der Farbe des Untersuchungsmaterials entsprechendes Aussehen verleiht. Mit Rücksicht auf die Schwierigkeiten, die sich uns speziell bei Eiweißtitrationen aus diesem Verfahren ergaben, verwendeten wir eine zweite Portion der zu titrierenden Flüssigkeit als Kontrolle.

Durch diese Modifikation werden die Schwierigkeiten, die sich aus der Eigenfarbe des Untersuchungsmaterials ergeben, allerdings völlig umgangen. Doch muß dafür auch ein kleiner Fehler in Kauf genommen werden, der darin liegt, daß Sörensen seine Kontrollflüssigkeit mit Formalin versetzen und in dieser Hinsicht hier ganz identische Verhältnisse wie in der titrierten Probe schaffen kann. Wir aber müssen selbstverständlich vom Formalinzusatz absehen, da ein solcher den Zweck der Kontrolle durch momentanen Reaktionsumschlag vereiteln würde. Nun ist es aber durchaus nicht gleichgültig, ob die Kontrollflüssigkeit Formalin enthält oder nicht. Merkwürdigerweise ist nämlich im ersteren Falle zur Erzielung des von Sörensen gewünschten roten Phenolphthaleintones mehr NaOH erforderlich als im zweiten, wiewohl das mit neutrali-

sierter Formalinlösung versetzte Wasser von vornherein einen deutlich roten Ton hat (wahrscheinlich infolge Hydrolyse des anwesenden ameisen-sauren Salzes). Der Unterschied zwischen den beiden Kontrollflüssigkeiten, wenn im ersten Falle 30 ccm Wasser und 20 ccm neutralisierter käuflicher Formalinlösung, im zweiten Falle lediglich 50 ccm Wasser verwendet werden und beiderseits je 1 ccm  $\frac{1}{2}\%$ ige Phenolphthaleinlösung zugesetzt wird, beträgt ca. 0,1 ccm  $\frac{1}{4}$  n-NaOH. Da dieser Fehler gegenüber den von uns bei der Titration gewonnenen Zahlen klein ist und sich überdies konstant wiederholt, haben wir ihn nicht weiter berücksichtigt. Er muß aber in Rechnung gezogen werden, wenn man außerordentlich geringe Aciditätszunahmen verwerten will, ein Fall, der bei dem schon erwähnten Studium des desamidierten Albumins gegeben war.

Wir gehen also folgendermaßen vor:

Nach entsprechend langer Dialyse (bei Ammonsulfatfällungen bis zum Verschwinden der Neßlerschen Reaktion) werden im allgemeinen vom Untersuchungsmaterial je 20 ccm in zwei gleiche Bechergläser gefüllt und hier nach Zusatz von je 1 ccm  $\frac{1}{2}\%$ iger Phenolphthaleinlösung (Lösungsmittel 50% Alkohol) bis zu einem ganz schwachen rosa Ton neutralisiert. In Fällen, wo ein Teil des Proteins durch die Dialyse ausgefallen ist (Globuline, primäre Albumosen), werden vor der Verfüllung in die beiden Bechergläser diese Eiweißniederschläge durch Zugabe von möglichst wenig konzentrierter Lauge in Lösung gebracht. Nun wird die eine (zur Kontrolle bestimmte) Probe bis zur stark roten Farbe mit  $\frac{1}{4}$  n-NaOH unter genauer Messung der verwendeten Laugenmenge versetzt, die andere (zur eigentlichen Formoltitration bestimmte) mit  $\frac{1}{4}$  n-HCl auf Lackmusneutralität gebracht. Sørensen versetzt nun diese auf Lackmusneutralität gebrachte Probe direkt mit Formalin, um dann anschließend die Titration mit Lauge auf den Farbenton der Kontrollflüssigkeit vorzunehmen. Dieses Vorgehen erheischt nun bei den Eiweißkörpern deswegen eine Abänderung, weil eine Reihe von ihnen bei Lackmusneutralität ein Neutralisationspräcipitat liefert. Diese Neutralisationspräcipitate lösen sich in einigen wenigen Fällen nach Zusatz des Formalins, in der Regel jedoch ist dies nicht nur nicht der Fall, sondern die Lösung des Präcipitates tritt auch am Ende der Titration nicht ein, wenn auch

die relativ beträchtliche Alkaleszenz der klaren oder nur leicht getrübbten Kontrolllösung erreicht ist. In diesen durchaus nicht seltenen Fällen scheint also das Formalin der Lösung des Neutralisationspräcipitates im Alkali, die bei der Kontrollflüssigkeit vollkommen oder annähernd vollkommen erfolgt, hinderlich zu sein. Diese Schwierigkeit gelang uns dadurch zu überwinden, daß wir das Formalin nicht wie Sørensen am Beginn der Titration zugeben, vielmehr nachdem die Lackmusneutralität erreicht ist, ohne Zusatz von Formalin, die Titration mit  $\frac{1}{4}$  n-NaOH einleiten. Erst nachdem die Alkalität eine so beträchtliche ist, daß sich das Präcipitat wieder gelöst hat, geben wir das Formalin zu und vollenden darauf die Titration, indem wir so viel  $\frac{1}{4}$  n-NaOH zusetzen, bis der Ton der Kontrolllösung erreicht ist. Von der Menge der verbrauchten Kalilauge wird wie üblich jene Menge subtrahiert, die für die Kontrolle benötigt wurde, um das blasse Rosa der Phenolphthaleinneutralität in sattes Rot zu verwandeln. Auf dieses starke Rot zu titrieren ist nicht nur im Interesse der Leichtigkeit und Genauigkeit der Bestimmung, sondern, wie Sørensen dargelegt hat, auch aus Gründen theoretisch-chemischer Natur unbedingt angezeigt. Die so ermittelte Menge verbrauchter  $\frac{1}{4}$  n-NaOH ist uns nach dem früher Gesagten ein Maß für die in der verarbeiteten Eiweißmenge enthaltenen endständigen Aminogruppen mit Ausnahme der in säureamidartiger Bindung ( $-\text{CONH}_2$ ) stehenden. Die Zahl der gefundenen Kubikzentimeter gibt mit 0,0035 multipliziert den Stickstoffwert in Grammen an. Bevor wir den methodischen Teil schließen, obliegt uns noch eine Rechtfertigung unserer Gepflogenheit, bei der Titration von der Lackmusneutralität und nicht von der Phenolphthaleinneutralität auszugehen. Wir haben uns in diesem Punkte gleichfalls an die von Sørensen für die Bestimmung der Aminosäuren gegebenen Vorschriften gehalten. Dieser Autor begründet im Verein mit Henriques<sup>1)</sup> die Anwendung der Lackmusneutralität damit, daß reine Aminosäuren, also solche mit völlig freien Amino- und völlig freien (nicht mit Metall besetzten) Carboxylgruppen, auf Lackmus neutral, aber auf Phenolphthalein schon sauer reagieren, während bei Phenol-

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 63.

phthaleinneutralität ein Teil der Aminosäuren in Form von Salzen vorhanden sein kann. Am Beginne der Titration müssen aber notwendigerweise die Carboxylgruppen frei (unversalzt) sein, demnach Lackmus-, nicht Phenolphthaleinneutralität bestehen. So lautet im Prinzip die übrigens nicht unwidersprochen gebliebene Argumentation Sörensens. Sie gilt für Aminosäuren. Über die Verhältnisse bei Eiweißkörpern wissen wir nichts. Hat doch noch niemand einen Eiweißkörper in der Hand gehabt, von dem er mit Sicherheit behaupten könnte, daß alle seine Carboxylgruppen frei sind.

Immerhin kann man, wie wir meinen, aus den Angaben Sörensens und Henriques' schließen, daß sich ganz allgemein mit dem Begriff der Lackmusneutralität im Gegensatz zu dem der Phenolphthaleinneutralität die Existenz freier und durch Carboxyl ungedeckter  $\text{NH}_2$ -Gruppen nicht verträgt. Diese Existenz aber ist im Interesse der Genauigkeit der Titration am meisten zu fürchten. Jener Neutralitätspunkt, bei dem sie ausgeschlossen ist, ist für den in Rede stehenden Zweck der geeignetste, und deswegen sind wir — in allerdings willkürlicher Weise die Verhältnisse bei Aminosäuren auf Eiweißkörper übertragend — bei unseren Titrationen immer von der Lackmusneutralität ausgegangen.

#### Verwendung der gewonnenen Resultate.

Wir sind, wie im vorhergehenden ausgeführt, der Ansicht, in den gewonnenen Resultaten einen mehr oder weniger genauen Ausdruck der in der titrierten Eiweißmenge enthaltenen endständigen  $\text{NH}_2$ -Gruppen zu haben.

Wir verhehlen uns aber nicht, daß gewisse, zum Teil bekannte, zum Teil vielleicht noch unbekanntere Atomgruppen an der Peripherie des Proteinmoleküls das Ergebnis der Titration etwas beeinflussen und so die vollkommene Richtigkeit unserer Auffassung in Frage stellen könnten. Diese Einschränkung betrifft selbstverständlich nur die Deutung unserer Resultate, nicht die Resultate selbst. Diese erscheinen uns vielmehr schon deshalb wertvoll, weil sie bei den einzelnen Proteinklassen konstante, für diese Klassen mehr oder weniger charakteristische Werte liefern. Um nun zu derartigen charakteristischen Zahlenwerten zu gelangen,

nahmen wir in den zur Titration verwendeten Proben nachträglich die Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl vor und dividierten den hierbei gewonnenen Wert (am einfachsten ausgedrückt in Kubikzentimetern  $\frac{1}{4}$  n-NaOH) durch den bei der Formoltitration gewonnenen. Auf diese Weise erhalten wir eine Zahl, die uns angibt, auf wie viele Atome Gesamtstickstoff durchschnittlich eine endständige  $\text{NH}_2$ -Gruppe kommt. Wir nennen diesen Quotienten den Aminoindex des betreffenden Eiweißkörpers. Es ist selbstverständlich, daß je größer der Index, desto geringer der Besitz des betreffenden Proteins an freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen ist. Es ist weiterhin selbstverständlich, daß je weiter wir im Eiweißabbau fortschreiten, desto mehr sich der Aminoindex der Spaltungsprodukte 1 nähert, und daß ein hoher Index für das Vorhandensein verhältnismäßig zahlreicher polypeptidartiger Bindungen, also ein kompliziertes Protein, spricht. Umgekehrt ist jedoch der Schluß aus einem niedrigen Index auf einen weit abgebauten Eiweißkörper durchaus nicht zwingend. Denn auch das an polypeptidartigen Bindungen reichste Eiweißmolekül liefert, wenn es mit einer entsprechend großen Anzahl endständige Aminogruppen tragender Seitenketten ausgestattet ist, einen niedrigen Index.

a) Der formoltitrimetrische Unterschied zwischen Albumin und Globulin.

Wir wendeten uns zunächst dem Studium der beiden wichtigsten Klassen der nativen Eiweißkörper zu, dem der Albumine und Globuline. Die zu untersuchenden Körper wurden durch Ammonsulfatfraktionierung gewonnen. Euglobulin und Pseudoglobulin durch  $\frac{1}{2}$  bzw.  $\frac{1}{2}$  Sättigung, Albumin durch Ganzsättigung. Hierauf wurde bis zum Verschwinden der Neßlerschen Reaktion dialysiert. Als Ausgangsmaterial verwendeten wir Serum, und zwar in den weitaus meisten Fällen solches vom Pferd, oft aber auch vom Rind, Hund, Schwein, Ziege, Huhn, Aalfisch, Haifisch, Octopus usw., für welche letztere wir Herrn Prof. Burian in Neapel zu großem Danke verpflichtet sind. Um auch noch dem Einwand zu begegnen, daß die Ammoniakkomponente des Aussalzungsmittels mit dem Eiweiß in irgendeiner, durch Neßlers Reagens nicht mehr nach-

weisbaren Weise verankert sei und als solche die Formoltitration beeinflusse, wurden die Globuline auch durch  $MgSO_4$ -Sättigung ausgesalzen. Die Resultate waren jedoch, dies sei gleich hier festgestellt, die gleichen wie bei Halbsättigung mit Ammoniumsulfat. Das Ergebnis dieser außerordentlich zahlreichen Versuche war ein eindeutiges: in sämtlichen Seren war der Aminoindex des Globulins ungleich größer als der des Albumins. So beträgt z. B. beim Pferd der Index des Albumins durchschnittlich 13, der des Globulins durchschnittlich 21.

Eine Abweichung von dieser Tatsache, daß die Zahl der endständigen Aminogruppen im Globulin viel geringer ist als im zugehörigen Albumin (in beiden Fällen auf die gleiche Menge Gesamt-N berechnet), wurde nie beobachtet.

Die absoluten Werte für den Index einer bestimmten Fraktion schwanken innerhalb gewisser Grenzen, aber diese Beziehung zwischen den bei Halbsättigung und den bei Ganzsättigung fallenden Körpern im Serum eines Tieres ändert sich nicht. Wie soeben erwähnt wurde, zeigen die absoluten Werte für Globulin, resp. Albumin gewisse Schwankungen. Die diesbezüglichen Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen und werden seinerzeit publiziert werden. Dieser Mitteilung vorgehend, muß jedoch schon an dieser Stelle die Frage erledigt werden, ob die gefundenen Unterschiede zwischen Albumin und Globulin absolute sind, d. h. ob bei der Untersuchung der Sera aller möglichen Spezies der höchste für ein Albumin gefundene Wert hinter dem niedrigsten für ein Globulin ermittelter noch zurückbleibt. Dies ist nun bemerkenswerterweise nicht der Fall. Die geschilderten Beziehungen zwischen Albumin und Globulin sind streng genommen nur relative, jedes Globulin hat einen bedeutend höheren Index als das zugehörige Albumin.

Gegenüber dem Albumin einer anderen Tierart jedoch kann es im Index sogar zurückbleiben. Eine gewisse absolute Gültigkeit haben die Aminoindexe höchstens innerhalb einer Tierklasse. So weichen die Werte der von uns untersuchten Säugetiere nur wenig von den früher für das Pferd angegebenen Zahlen (Albumin ca. 13, Globulin ca. 21) ab und der Unter-

schied zwischen Albumin und Globulin ist hier also nicht nur ein relativer, sondern auch ein absoluter. Als wir aber auch Vogelsera in den Kreis unserer Betrachtungen zogen, fanden wir bisweilen einen Albumin-Index von nicht weniger als 22, der somit in der Größenordnung des Säugetier-Globulins rangiert. Das zugehörige Globulin jedoch hatte entsprechend der von uns ermittelten Regel einen noch höheren Index, nämlich 33.

Nach dieser Feststellung wurde auch ein pflanzliches Globulin — Edestin — in Untersuchung genommen und in der üblichen Weise verarbeitet. Der ermittelte Index betrug 22, erreicht also eine Höhe, wie sie den meisten untersuchten tierischen Globulinen zukommt. Zwischen Euglobulin und Pseudoglobulin konnte ein konstanter Unterschied nicht ermittelt werden.

Es mag hier am Platze sein, die Fehlergrenzen bei der Ermittlung eines solchen Aminoindex zu besprechen. Man muß hierbei zweierlei ins Auge fassen. Erstens die rein methodische Fehlerweite, ermittelt durch mehrfache Untersuchung eines und desselben rein dargestellten Eiweißkörpers. Sie fällt naturgemäß zusammen mit der Fehlerweite der Formoltitration in Eiweißlösungen und ist im allgemeinen ebenso gering wie bei der Titration wässriger Aminosäurelösungen. Eine Ausnahme machen getrübe oder stark gefärbte Flüssigkeiten (hämolytisches Serum). Hier erfordert das Erkennen des Endpunktes ziemliche Übung, ist aber fast mit der gleichen Genauigkeit möglich wie in den einfachen Fällen.

Größer gestalten sich aber die Differenzen, wenn man die Werte nebeneinanderstellt, die die Untersuchung einer bestimmten Fraktion in Seren verschiedener Individuen einer Tierart, z. B. Pferd, liefert. Hier spielt erstens die in der Methodik der Ammonsulfatfällung begründete Schwierigkeit eine Rolle, ganz reine Fraktionen zu erhalten. Doch ist auch der hieraus resultierende Fehler ein geringer, da ein Serum, in mehreren getrennten Portionen der fraktionierten Aussalzung unterworfen, keine nennenswerten Differenzen des betreffenden Index in den einzelnen Portionen lieferte. Die letzterwähnten Differenzen scheinen vielmehr tatsächlich einer verschiedenen Beschaffenheit der betreffenden Eiweißkörper zu entsprechen,

die ihren Grund in der Verschiedenheit gewisser äußerer Bedingungen wie etwa des Ernährungszustandes hat. Wir haben gerade in Hinsicht auf diesen letzteren Punkt eingehende Untersuchungen angestellt, die allerdings noch nicht zum Abschlusse gelangt sind. Im folgenden seien zur Demonstration der in Rede stehenden Differenzen die Ergebnisse der Bestimmung des Aminoindex an vier verschiedenen Pferde-Seren wiedergegeben.

Nr.	Datum	Aminoindex des Albumins	Aminoindex des Euglobulins	Aminoindex des Pseudoglobulins
1	10. XII. 1910	13,8	19,8	20,8
2	14. XII. 1910	13,4	21,6	22,1
3	25. I. 1911	13,3	nicht bestimmt	nicht bestimmt
4	18. II. 1911	13,8	22,3	19,1

Die Differenzen in dieser Versuchsreihe betragen sonach beim Albumin 3%, beim Euglobulin 7%, beim Pseudoglobulin 8% von dem berechneten Durchschnittswert. Diese Abweichungen könnten jedoch noch viel größer sein, ohne daß der von uns gefundene Unterschied zwischen Globulin und Albumin an Verlässlichkeit Einbuße litt. Denn wenn wir die beiden Werte von Albumin und Globulin, die sich am meisten nähern, miteinander in Relation setzen, so finden wir, daß der Unterschied 28% vom Werte des Globulins, 38% von dem des Albumins beträgt.

Ausgerüstet mit diesem Kriterium zur Unterscheidung zwischen Globulin und Albumin konnten wir daran gehen, es auf einen Fall anzuwenden, wo die Anwendung eines neuen Kriteriums wissenschaftliches Interesse hat. Moll<sup>1)</sup> hat angegeben, daß Albuminlösungen bei schwach alkalischer Reaktion durch 1 Stunde auf 60° erhitzt, in betreff der Fällungsgrenzen und auch anderer Kriterien das Verhalten der Globuline annehmen. Wir haben nun den nach Moll dargestellten Körper unter strenger Einhaltung seiner Angaben isoliert und der Formoltitration zugeführt. Der gefundene Index wich in keiner Weise von dem als Ausgangsmaterial dienenden Albumin ab. Dieses Verhalten spricht gegen eine Identität des dargestellten Körpers mit Globulin.

<sup>1)</sup> Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4.



Die Bestimmung des Aminoindex scheint uns auch einen neuen Weg zu liefern zur Ermittlung der Säurigkeit des Eiweißmoleküls. Ist ja doch die letztere wohl ausschließlich eine Funktion der endständigen Aminogruppen. Bemerkenswerterweise nun liefert die auf diese Weise vorgenommene Bestimmung der Säurigkeit des Eiweißmoleküls einen viel geringeren Wert als die bis jetzt üblichen Methoden. Nimmt man nämlich mit Kurajeff<sup>1)</sup> den Stickstoffgehalt des Serumalbumin-Moleküles mit 115 Atomen an, so wären darin, da sein Aminoindex 13 beträgt  $\frac{115}{13} = \text{ca. } 9$  säurebindende Gruppen vorhanden. Die im Vergleich damit beträchtliche Höhe der gegenwärtig geltenden Werte könnte sich, wie ja auch Cohnheim<sup>2)</sup> ausführt, damit erklären, daß bei der als Grundlage der Berechnung herangezogenen Bestimmung des Äquivalentgewichtes auch die polypeptidartig gebundenen NH-Gruppen Säure zu binden scheinen.

Wie schon im Verlaufe der Arbeit erwähnt wurde, haben wir die Ermittlung des Aminoindex noch zum Zwecke anderweitiger Differenzierungen herangezogen. So studierten wir noch die Unterschiede zwischen analogen Fraktionen bei verschiedenen Tierklassen, den Einfluß von Hunger und Nahrungszufuhr usw. Auch der Index der noch eiweißartigen Produkte peptischer und tryptischer Verdauung war Gegenstand unserer Untersuchung. Die diesbezüglichen Untersuchungen sind jedoch noch nicht völlig abgeschlossen. Die Ergebnisse sollen seinerzeit mitgeteilt werden.

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie 22, 462.

<sup>2)</sup> Chemie der Eiweißkörper, 3. Aufl., S. 78 und 126.

Bemerkung zu der Arbeit von K. Reicher und E. H. Stein.

(Diese Zeitschr. 37, 3. und 4. Heft, 321 bis 344.)

Von

J. Forschbach und J. Severin.

(Eingegangen am 6. Dezember 1911.)

Reicher und Stein geben „aus äußeren Gründen“ erst jetzt in dieser Zeitschrift eine ausführliche Darstellung der Methode der Kohlenhydratbestimmung, die sie in Kürze bereits auf dem Kongreß für innere Medizin im Jahre 1910, also vor 1½ Jahren, publiziert haben. Inzwischen ist vor 7 Monaten (Centralbl. f. Phys. u. Pathol. d. ges. Stoffw. 1911, 1. Märzheft) von unserer Seite eine Kritik dieser Methode erfolgt, die für ihre Bewertung von Bedeutung ist. Die Erwähnung unserer Arbeit haben die Autoren nach dem Inhalt der Bemerkung auf S. 341 wohl deshalb unterlassen, weil sie „aus bestimmten Gründen Wert darauf legen, die Veröffentlichung“ des methodischen Teiles „unverändert in der Form, in der er ursprünglich (im Frühjahr 1910) niedergeschrieben wurde, erfolgen zu lassen“. Auffallend bleibt dann nur, daß Reicher und Stein in dem im April 1910 abgeschlossenen und niedergeschriebenen methodischen Teil auf eine Arbeit von Alberda van Ekenstein und Blanksma eingehen, die der Redaktion der Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft erst am 19. Juli 1910 zugegangen ist.

Zu dieser neueren Literatur über den Gegenstand hätte unseres Erachtens auch unsere Arbeit gehört.

---

Bemerkung zur vorausgehenden Notiz der Herren Forschbach und Severin.

Von

K. Reicher und E. H. Stein.

Die Herren Forschbach und Severin wollen einen Widerspruch in den Angaben unserer Mitteilung (diese Zeitschr. 37, 321), nach der unsere Arbeit so publiziert worden ist, wie sie vor 1½ Jahren niedergeschrieben wurde, aus der Tatsache ableiten, daß in unserer Arbeit die im Jahre 1910 einige Zeit nach Abschluß unserer Arbeit erschienene Publikation von Alberda van Ekenstein und Blanksma berücksichtigt ist. Hierzu bemerken wir, daß wohl überall die Gepflogenheit besteht, eine wichtige Arbeit zu zitieren, auch wenn sie nach Fertigstellung der betreffenden Publikation erschienen ist.

Wenn wir auf die Mitteilung der Herren Forschbach und Severin nicht direkt eingegangen sind, so liegt der Grund darin, daß die Besprechung ihrer Ergebnisse den Gegenstand einer ausführlichen besonderen Mitteilung an anderem Ort bilden wird.

---

# Photographische Bestimmung der Intensitätsverteilung in Blutspektren.

Von

W. Heubner (Göttingen) und H. Rosenberg (Tübingen).

(Eingegangen am 19. Dezember 1911.)

Mit 2 Figuren im Text und 3 Tafeln.

## I.

Für die Identifizierung und das Studium des Blutfarbstoffes waren von jeher seine spektralen Eigenschaften von großer Bedeutung. Zu deren Untersuchung sind bisher nach zwei Richtungen hochentwickelte Methoden ausgebildet: Einmal handelte es sich darum, die Lage der verschiedenen Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins und seiner Derivate im Spektrum (d. h. ihre Wellenlänge) mit möglicher Präzision zu bestimmen; hier führte die photographische Fixierung der betreffenden Spektren und Ausmessung auf der Platte zu erhöhter Genauigkeit und brachte auch gegenüber den rein optischen Methoden die Ausdehnung des Untersuchungsbereiches auf das ultraviolette Gebiet<sup>1)</sup>. Zweitens aber war es von Wichtigkeit, den Grad der Lichtauslöschung in den verschiedenen Absorptionsstreifen, allgemeiner: die Absorptionskoeffizienten in den verschiedenen Spektralbezirken kennen zu lernen; erst die spektralphotometrischen Messungen, wie sie besonders Hüfner<sup>2)</sup> in glänzender Weise ausbildete und verwertete, erlaubten Urteile in quantitativer Beziehung.

---

<sup>1)</sup> Siehe Lewin, Miethe und Stenger, Arch. f. d. ges. Physiol. 118, 80, 1907. — Rost, Franz und Heise, Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 32, 223, 1909.

<sup>2)</sup> Literatur siehe bei Bürker in Tigerstedts Handbuch der physiologischen Methodik 2, I, 322 ff., 1910.

Ein Bedürfnis zu einer weiteren Vervollkommnung der spektralphotometrischen Methoden schien uns gegeben durch die Tatsache, daß verschiedene Beobachter bei Anwendung der bisher üblichen Methode zu teilweise abweichenden Resultaten gelangt sind. Offenbar erfordern die optisch-spektralphotometrischen Beobachtungen ein besonders hohes Maß experimenteller Sorgfalt und sind überdies dem Einfluß physiologischer Fehlerquellen unterworfen, die auf eine Verschiedenheit der Farbempfindlichkeit für verschiedene Beobachter und vielleicht auch noch auf einen, für ein und denselben Beobachter bestehenden Zusammenhang seiner Farbempfindlichkeit mit der absoluten Leuchtkraft der benutzten Lichtquelle hinzudeuten scheinen. Die Richtung, in der eine Verbesserung der Methode zu erwarten war, lag vorgezeichnet in der schon so vielfach mit gutem Erfolg geübten Fixierung des Spektralbildes auf der photographischen Platte. Die Methode bietet zugleich den Vorteil, daß die langdauernde photometrische Ausmessung getrennt wird von der rasch ausführbaren, gleichzeitigen Fixierung des gesamten Spektralbildes, so daß man z. B. schnelle chemische Reaktionen, die mit einer Änderung der Lichtauslöschung einhergehen, in ihrem ganzen Verlauf bequem und sicher verfolgen kann. In der Astronomie werden seit einiger Zeit photographische Aufnahmen mit gutem Erfolge zur Helligkeitsbestimmung von Sternen benutzt; und ein Astronom ist es auch gewesen, K. Schwarzschild, der die grundlegenden Untersuchungen<sup>1)</sup> ausführte, die zur Ausbildung der photographisch-photometrischen Methoden führten, und der diese Methoden als erster in größerem Maßstab verwertet<sup>2)</sup> hat; in jüngster Zeit sind diese Methoden dann auch auf spektral-photometrische Studien an Gestirnen ausgedehnt worden.

## II.

Schon der Anblick einer jeden guten Photographie lehrt uns eigentlich, daß die photographische Platte für feine Lichtabstufungen mindestens die gleiche Empfindlichkeit besitzt wie

<sup>1)</sup> Publikationen der v. Kuffnerschen Sternwarte in Wien. V. Abteil. Band C. 1900.

<sup>2)</sup> Astronomische Mitteilungen der Königlichen Sternwarte zu Göttingen. 14. Teil. 1910.

unser Auge; ja die Möglichkeit, durch geeignete Behandlung eine „harte“ Platte zu erzielen, d. h. eine Platte, wo alle Kontraste stärker hervortreten, als wir sie in Wahrheit beobachten, deutet darauf hin, daß die Platte in dieser Beziehung unserem Auge vielleicht noch überlegen ist. Eine auf Beurteilung der Dichtigkeit des Silberniederschlages begründete Photometrie läßt demnach Resultate erwarten, die durchaus mit denen der optisch-photometrischen Methoden konkurrieren können: Es ergibt sich die Aufgabe, das Verhältnis der Menge des reduzierten Silbers pro Flächeneinheit zu der auffallenden Lichtmenge zu bestimmen. Der Lösung dieser Aufgabe stellen sich sehr große Schwierigkeiten entgegen, wenn man die in Frage kommenden Größen ihrem absoluten Betrage nach ermitteln wollte, da die Dichtigkeit des Silberniederschlages nicht allein von dem einwirkenden Licht, sondern von der Empfindlichkeit der betreffenden Platte, von der Natur und Temperatur des benutzten Entwicklers, von der Zeit der Entwicklung usw. abhängt<sup>1)</sup>. In der Photometrie handelt es sich aber ganz allgemein nicht um die Messung der Intensitäten selbst, sondern stets nur um Helligkeitsunterschiede, um Verhältnisse von Intensitäten; und solche Größen sind es auch, die wir aus den photographischen Aufnahmen abzuleiten wünschen. Als Maß für die Dichtigkeit des Silberniederschlages dient dabei die größere oder geringere Absorption, die verschieden dichte Teile der Platte auf durchfallendes Licht ausüben und die man allgemein als „Schwärzung“ zu bezeichnen pflegt.

Das Verhältnis von Schwärzungsunterschieden zu den entsprechenden Lichtintensitätsunterschieden läßt sich nun für eine photographische Platte ermitteln, indem man auf benachbarte Teile der Platte verschiedene, jedoch in genau bekannter Weise abgestufte Lichtintensitäten einwirken läßt und dann die resultierenden Schwärzungen als Funktion der bekannten Intensitätsverhältnisse darstellt. Die Aufnahmen können sowohl gleichzeitig als auch nacheinander erfolgen, doch ist im letzten Falle unbedingt darauf zu achten, daß für alle genau die gleiche Expositionszeit innegehalten

<sup>1)</sup> Vgl. J. M. Eder, System der Sensitometrie photographischer Platten (Sitzungsber. d. Wien. Akad. Math.-nat. Klasse 108, Abt. II, Nov. 1899).

wird, da nicht nur eine Änderung der Intensität, sondern auch eine Veränderung der Expositionszeit eine Variation der Schwärzung herbeiführen würde. Auf welche Weise die Intensitätsänderung zustande kommt, bleibt im Prinzip gleichgültig. Man kann z. B. das Licht einer konstanten Lichtquelle durch zwei unter meßbar veränderlichem Winkel gekreuzte Nicolsche Prismen treten lassen, wo der Winkel selbst nach den bekannten Polarisationsgesetzen ein Maß für die Intensitätsänderung bildet; auch eine Entfernungsänderung zwischen Lichtquelle und Platte oder Zwischenschaltung von Gitterblenden, deren Absorptionsvermögen vorher auf der optischen Bank zu bestimmen wäre, können in Frage kommen. Schließlich könnte man auch daran denken, die Variation der auf die Platte einwirkenden Lichtmenge durch eine Variation der Expositionszeit zu ersetzen, soweit die Regel gilt, daß für die photographische Platte eine bestimmte Verkürzung der Expositionszeit einer bestimmten — für alle vorkommenden Intensitäten gleichen — Abschwächung der Intensität äquivalent ist.

Die Untersuchungen von Schwarzschild<sup>1)</sup> haben nun gezeigt, daß diese Anforderung innerhalb weiter Grenzen tatsächlich erfüllt ist; dabei ist allerdings der Zusammenhang zwischen Expositionsänderung und Intensitätsänderung für jede Plattensorte zunächst experimentell zu ermitteln, während er für verschiedene Platten der gleichen Sorte konstant zu sein scheint. Als Hauptresultat der Untersuchungen von Schwarzschild sei angeführt, daß für zwei verschiedene Intensitäten  $J$  und  $J'$ , die bei den Expositionszeiten  $t$  und  $t'$  die gleiche Schwärzung erzeugen, die Beziehung gilt

$$\frac{J}{J'} = \left(\frac{t'}{t}\right)^p,$$

wo  $p$  eine für jede Plattensorte besonders zu ermittelnde Konstante darstellt, die jedoch für die verschiedenen im Handel vorkommenden Sorten ziemlich weit variieren kann. Als Mittel aus den für eine größere Anzahl verschiedener Plattensorten abgeleiteten Werten ergibt sich etwa

$$p = 0,85,$$

die weitesten bisher beobachteten Abweichungen des  $p$ -Wertes von diesem Mittel liegen bei 0,6 und 1,0.

Aus der Konstanz von  $p$  folgt, „daß der Intensitätsgewinn bei Verlängerung der Expositionszeit in einem bestimmten Verhältnis unabhängig ist sowohl von der absoluten Größe der Expositionszeit, als auch von der absoluten Lichtinten-

<sup>1)</sup> Schwarzschild l. c., 9 ff., 1900.

sität“, ein Satz, der mit unserer obigen Forderung identisch ist. Man ist also nach diesem Resultat durchaus berechtigt, auch eine Variation der Expositionszeit als messenden Faktor einzuführen.

Die Arbeiten von Schwarzschild beschäftigen sich nur mit der photographisch wirksamen Gesamtstrahlung der Gestirne und liefern daher keinen Beitrag zu der Frage, ob die Konstanz von  $p$  auch für Strahlen verschiedener Wellenlänge gilt.

Zur Beurteilung der verschiedenen auf einer Platte vorhandenen Schwärzungen bedarf man irgendeiner Schwärzungsskala, die mit der Platte verglichen wird. Eine derartige Skala könnte man sich z. B. in der Weise herstellen, daß man eine Lichtquelle mit nach einem bestimmten Gesichtspunkt stets verlängerten Expositionen auf benachbarte Stellen einer Platte einwirken läßt, so daß diese also eine fortschreitende Reihe von zunehmenden Schwärzungen enthält. Am zweckmäßigsten bedient man sich dazu aber eines sogenannten „photographischen Keils“, d. h. einer streifenförmigen photographischen Platte, die in ihrer Längsausdehnung alle Schwärzungsgrade — von den schwächsten bis zu den kräftigsten — in kontinuierlicher Folge aufweist, während die Schwärzung in der dazu senkrechten Richtung für jede Stelle des Keils konstant ist. Jede beliebige zu bestimmende Schwärzung ist dann gleich einer anderen an einer bestimmten Stelle des Keiles liegenden Schwärzung, die durch ihre Entfernung von einem auf dem Keil beliebig zu wählenden Nullpunkt in Längeneinheiten eindeutig angegeben werden kann. Eine in diesen Einheiten ausgedrückte Skala gibt dann aber nicht mehr direkte Schwärzungsunterschiede, d. h. das Verhältnis der an zwei verschiedenen Keilstellen absorbierten Lichtintensitäten an, sondern man kann nur so viel sagen, daß die Keilablesungen eine stetige Funktion der Schwärzungen sein werden und daß zu größeren Argumentwerten auch größere Funktionswerte gehören. Die Funktion selbst wäre übrigens mit Hilfe photometrischer Messungen für jeden Keil leicht empirisch zu ermitteln. Bei vielen Arbeiten wird es jedoch gar nicht darauf ankommen, die Schwärzung selbst zu kennen; nämlich überall dort, wo der Zusammenhang zwischen Lichtintensität und Schwärzung aus den zu diesem Zweck auf der gleichen Platte eigens vorhandenen Kontrollaufnahmen abgeleitet wird, können die Schwärzungen in der willkürlichen Längenskala des Keiles ausgedrückt werden.

Derartige „Keile“ lassen sich leicht aus jeder photographischen Platte herstellen mit Hilfe des Scheinerschen Sensitometers<sup>1)</sup>, das auf dem Prinzip der rotierenden Blende beruht.

Zum Vergleichen der Schwärzungen auf den zu untersuchenden Platten mit denjenigen des photographischen Keils diente uns ein Hartmannsches Mikrophotometer<sup>2)</sup>, das mit einem — dem Objekttreuztisch eines Mikroskops analog konstruierten — Koordinaten-Meßapparat versehen war.

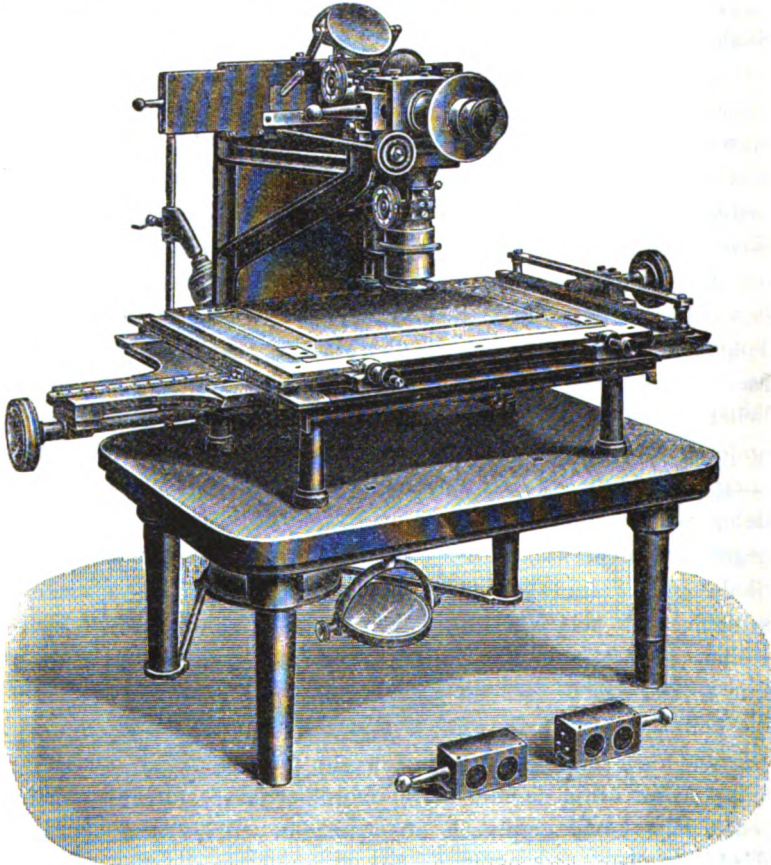


Fig. 1.

<sup>1)</sup> Vgl. Zeitschr. f. Instrumentenkunde 1894, Heft 6 und Photographische Korrespondenz, Wien - Leipzig, 1894, Heft 9. Bezugsquelle für das Sensitometer ist der Mechaniker: Otto Toepfer & Sohn, Potsdam.

<sup>2)</sup> Vgl. Zeitschr. f. Instrumentenkunde 1890, Heft 4. Bezugsquelle für das Mikrophotometer: Otto Toepfer & Sohn, Potsdam.



Das Prinzip des Hartmannschen Mikrophotometers besteht darin, die zu vergleichenden Schwärzungen von Platte und Keil in dem Gesichtsfelde eines Mikroskopes in scharfer Trennungslinie aneinander grenzen zu lassen, d. h. unter Verhältnissen, wo Helligkeitsdifferenzen vom Auge am schärfsten aufgefaßt werden. Erreicht wird dieser Zweck dadurch, daß Strahlen ein und derselben Lichtquelle auf zwei verschiedenen Wegen von genau gleicher Weglänge und durch genau gleichartige Medien in das Auge gelangen; dabei passiert das Licht auf dem einen Wege die zu messende Platte, auf dem anderen einen als Messungskala dienenden photographischen Keil. Mit Hilfe zweier identischer Mikroskop-Objektive und eines Lummer-Brodhunschen Würfels werden vergrößerte, reelle Bilder der beiden Gelatine-Silberschichten in einer Ebene abgebildet und durch ein gemeinsames Mikroskopokular betrachtet. Dabei erscheint der an dem kleinen Spiegel des Lummer-Brodhun-Prismas reflektierte Ausschnitt der zu messenden Platte als isolierter, scharf begrenzter Fleck mitten im Gesichtsfeld, das durch einen Teil des Keilbildes ausgefüllt wird.

Die Messung einer beliebigen Schwärzung geht nun in der Weise vor sich, daß man durch Verschieben des Keiles vor dem einen Mikroskopobjektiv das Gesichtsfeld um den kleinen, durch den Spiegel verursachten Ausschnitt herum auf die gleiche Helligkeit zu bringen sucht, wie den im Spiegel abgebildeten Teil der untersuchten Platte. Es gelingt dies mit recht großer Sicherheit, da bei tatsächlich vorhandener Intensitätsgleichheit die Trennungslinie zwischen Untergrund und Photometerfleck vollständig verschwindet und das ganze Gesichtsfeld gleichmäßig erhellt erscheint; bei nicht korrekter Einstellung hingegen hebt sich das Bild der Platte hell oder dunkel von dem Untergrunde ab. Die Längsverschiebung des Keils kann mit Hilfe eines Nonius an einer Längenteilung bis auf 0,1 mm genau abgelesen werden.

Die beiden Abbildungen (Fig. 1 u. 2, S. 350 u. 352) geben den Anblick des ganzen Instrumentes und zeigen auch den Weg des Strahlenganges.

Der Spiegel des Lummer-Brodhun-Prismas hatte bei unserem Instrument die Form eines schmalen Rechtecks, dessen Längsausdehnung senkrecht zur Längsausdehnung des auszumessenden

Spektrums, also parallel der Spalttrichtung des Spektrographen stand. Unter Berücksichtigung der Dispersion des weiter unten erwähnten Spektrographen und der Vergrößerung des Mikroskops blendete dieser Spiegel aus den Spektren einen Streifen heraus, dessen Ränder einem Unterschied von  $0,35 \mu\mu$  Wellenlänge entsprachen.

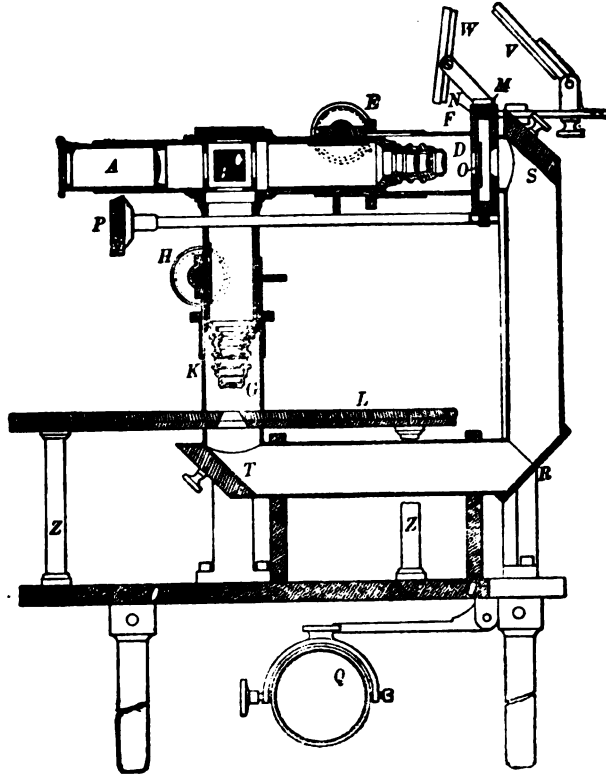


Fig. 2.

## Erläuterung zu Fig. 2.

*A* ist das Okular, *B* und *C* die beiden Hälften des Lummer-Brodhuns-Würfels, *H* und *E* die Triebschrauben zur Focussierung der beiden Mikroskopobjektive *D* und *G*. Der photographische Keil *O* wird durch den Trieb *P* in der Fassung *M* verschoben, die Verschiebung an dem Nonius *N* abgelesen. Die zu messende Platte liegt auf dem Tisch *L*. Um Platte und Keil vor falschem, von der Vorderseite auffallendem Licht zu schützen, ist der Zwischenraum zwischen Mikroskopobjektiv und Platte resp. Keil durch die beiden Rohrstutzen *F* und *K* lichtdicht abgeschlossen. Zur Beleuchtung dient eine künstliche Lichtquelle, die direkt hinter der dünnen durchscheinenden weißen Porzellanplatte *R* aufgestellt wird; durch Reflexion an den Spiegeln *S* und *T* gelangt das Licht zum Keil resp. zur Platte. Die Spiegel *V* und *W* dienen zur Beleuchtung des Nonius.

Hat man mit Hilfe eines derartigen Instrumentes bestimmte Zahlenwerte für die Schwärzungsunterschiede gewonnen, so lassen sich diese als Funktion der als bekannt vorausgesetzten Intensitätsverhältnisse darstellen. Am besten wird dies graphisch geschehen; man erhält dann eine Kurve, aus der durch Interpolation für beliebige Schwärzungen das entsprechende Intensitätsverhältnis abzulesen ist. Man nennt diese Kurve die Schwärzungskurve oder die charakteristische Kurve der Platte; sie ist im allgemeinen für jede Platte verschieden und muß daher für jede Platte aus besonders dazu aufgenommenen Kontrollexpositionen abgeleitet werden.

Zur Festlegung der Schwärzungskurve bedarf man einer ganzen Anzahl von Schwärzungszahlen, die über die ganze Kurve möglichst gleichmäßig verteilt sind, und für die sämtlich das zugehörige Intensitätsverhältnis gegen den Nullpunkt der Skala bekannt sein muß. Häufig ist es aber aus praktischen Gründen nicht möglich, eine genügende Anzahl meßbar veränderter Lichteindrücke auf die Platte wirken zu lassen; Zeitökonomie sowohl, als auch die Notwendigkeit, noch genügenden Platz auf der Platte frei zu behalten, lassen dann eine andere Anordnung als geboten erscheinen. Diese besteht darin, daß man gleichzeitig eine größere Anzahl möglichst verschiedener Schwärzungen durch eine einzige Exposition zu erhalten versucht, wobei die wahren Intensitätsverhältnisse, die diesen Schwärzungen entsprechen, nicht bekannt zu sein brauchen. (Es kann dies z. B. in der Weise geschehen, daß man den betreffenden Teil der Platte durch einen „photographischen Keil“ hindurch belichtet, wodurch auf der Platte ein Negativbild des Keils erzeugt wird.) Dann verändert man bei einer zweiten Aufnahme alle Intensitäten auf einmal im gleichen Verhältnis, was nach einer der oben erwähnten Methoden — also durch Abstandänderung, Filterabblendung, Veränderung der Expositionszeit usw. — erfolgen kann.

Wie aus einer derartigen Doppelaufnahme die Intensitätsverhältnisse abgeleitet werden, auf denen die verschiedenen Schwärzungen der einzelnen Aufnahme beruhen, ist ebenfalls von Schwarzschild<sup>1)</sup> gezeigt worden. Die Aufgabe hat den

<sup>1)</sup> K. Schwarzschild, Über eine Interpolationsaufgabe der Aktinometrie. *Astronomische Nachrichten* 172, Nr. 4109, 1906 und *Astronomische Mitteilungen der Kgl. Sternwarte zu Göttingen*, 14. Teil, S. 11 ff.

Charakter einer Interpolationsaufgabe und ihre Lösung ist dementsprechend mit einer gewissen Unbestimmtheit behaftet.

Bezeichnet man die Reihe der Intensitäten, die bei der ersten Aufnahme wirken, mit  $J$ , die entsprechenden Intensitäten bei der zweiten Aufnahme mit  $J'$ , so ist nach der Voraussetzung das Verhältnis  $J:J'$  für je zwei korrespondierende Intensitäten konstant:

$$\frac{J}{J'} = k$$

oder logarithmisch

$$\lg J - \lg J' = \lg k.$$

Wie groß  $k$  gewählt wird, ist in der Theorie gleichgültig, in der Praxis wird man aber gut tun,  $k$  weder zu groß noch zu klein werden zu lassen, und die Erfahrung hat gelehrt, daß der am besten geeignete Wert für  $k$  etwa bei 2,5, für  $\lg k$  also sehr nahe bei 0,4 liegt<sup>1)</sup>. Soll die Intensitätsänderung zwischen den beiden Aufnahmen durch eine Variation der Belichtungszeit bewirkt werden, so muß man diese ungefähr im Verhältnis 1:3 ändern, damit  $\lg k$  den Wert 0,4 annimmt.

Die Ausmessung der Platte liefert eine Reihe von Schwärzungspaaren  $S$  und  $S'$ , deren Differenz jedesmal dem Intensitätsverhältnis  $\frac{J}{J'} = k$  entspricht und aus dem die Schwärzungskurve der Platte abzuleiten ist. Die Aufgabe reduziert sich auf eine von Abel aufgestellte Funktionalgleichung, deren Lösung von Schwarzschild in der genannten Arbeit gegeben wurde. In der Praxis stellt sich das Verfahren nach den Vorschriften von Schwarzschild etwa folgendermaßen:

Die Differenz der zueinander gehörigen Schwärzung  $S' - S$  wird graphisch als Funktion der Schwärzungen  $S$  auf Millimeterpapier aufgetragen und durch einen möglichst glatten Kurvenzug interpoliert; die so entstandene Kurve haben wir als „Gradationskurve“ bezeichnet.

<sup>1)</sup> Es möge hier erwähnt werden, daß es in der Astronomie üblich ist, die Helligkeitsverhältnisse der Sterne in Größenklassen anzugeben, und daß die Größenklasse definiert ist durch die Gleichung:

$$1 \text{ Größenklasse} = \frac{\lg J - \lg J'}{0,4}.$$

Wenn wir also mit Größenklassen anstatt mit Helligkeitalogarithmen operieren, so würde der günstigste Wert für  $\lg k$  etwa gleich 1 werden.

Diese Gradationskurve denke man sich in ihrem mittleren Stück ersetzt durch eine sehr nahe berührende gerade Linie, deren Gleichung lauten wird:

$$S' - a = b(S - a),$$

wo  $a$  und  $b$  Konstanten sind, die aus dem Stück der Gradationskurve abgeleitet werden, wo Kurve und gerade Linie übereinstimmen<sup>1)</sup>.

Wäre diese Beziehung durchgehends richtig, d. h. würde sich die Gradationskurve in ihrem ganzen Verlauf der geraden Linie anschmiegen, so kann nach Schwarzschild für die Beziehungen zwischen Intensitätslogarithmen und Schwärzungen der Ausdruck angesetzt werden:

$$\lg J = \frac{\lg k \cdot \lg(S - a)}{\lg b}.$$

Bei dieser Reduktion ist der Nullpunkt in der Skala der Intensitätslogarithmen vollständig willkürlich gewählt, so daß sich nichts über die absoluten Intensitäten aussagen läßt, sondern aus der so erhaltenen Schwärzungskurve ist, streng genommen, nur das Intensitätsverhältnis eines beliebigen  $J$  zu der dem Nullpunkt der Skala entsprechenden Intensität  $J_0$  abzulesen. Also:

$$\lg J_0 - \lg J = \frac{\lg k}{\lg b} [\lg(S_0 - a) - \lg(S - a)]$$

und daraus das Intensitätsverhältnis zwischen zwei beliebigen Intensitäten bestimmen, die den Schwärzungen  $S_1$  und  $S_2$  entsprechen mögen.

Da nun die gerade Linie aber nur den mittleren Teil der Gradationskurve darstellt, so wird diese Beziehung auch nur für die mittleren Schwärzungen gelten; indessen ist es leicht, die vollständige Schwärzungskurve zu erhalten, wenn man nur erst ein mittleres Stück derselben hat. Für denjenigen Schwärzungsbereich, wo sich die Gerade der Gradationskurve eng an-

---

<sup>1)</sup> Ist dies der Fall für eine Strecke der Kurve, die begrenzt wird von den Punkten mit den Koordinaten  $S_1, S_1' - S_1$  und  $S_2, S_2' - S_2$ , so wird:

$$b = \frac{S_1' - S_2'}{S_1 - S_2} \quad \text{und} \quad a = \frac{S_1' - bS_1}{1 - b}.$$

schmiegt, ist die Schwärzungskurve zweifellos als richtig zu betrachten; für größere resp. kleinere  $S$  und  $S'$  wird man die an die zugehörigen  $\lg J$  und  $\lg J'$  anzubringenden Korrekturen ohne weiteres aus der Bedingung herausfinden, daß  $\lg J - \lg J'$  stets gleich  $\lg k$  sein muß. Indem man auf diese Weise nacheinander zu immer größeren resp. kleineren  $S$  und  $S'$  gelangt, kann man sukzessive für das ganze Gebiet der Gradationskurve die Korrekturen erhalten. Das weiter unten angeführte Beispiel wird das Verfahren am besten klarstellen.

Diese Methode zur Ableitung der Intensitätsverhältnisse setzt voraus, daß die Schwärzungskurve für alle auf die Platte fallenden Strahlungen in gleicher Weise gültig ist. Bei Messungen der photographisch wirksamen Gesamtstrahlung der Sterne ist dies nach Schwarzschild ohne Einschränkung richtig, selbst wenn es sich dabei um sehr verschiedene Temperaturen — also auch Farben — der Himmelskörper handeln sollte. Anders liegen die Verhältnisse bei spektral zerlegtem Licht, wo die Schwärzungskurve für die verschiedenen Wellenlängen einen verschiedenen Verlauf zu zeigen scheint<sup>1)</sup>; handelt es sich um die Vergleichung von Intensitäten, die nahe demselben Spektralgebiet angehören, so wird es auch hier erlaubt sein, sie alle mit einer gleichen, für das betreffende Spektralgebiet geltenden Schwärzungskurve zu reduzieren. Bei Strahlen, die sehr verschiedenen Wellenlängen zugehören, ist dies aber nicht mehr zulässig; dann müssen die für die betreffenden Wellenlängen geltenden Schwärzungskurven besonders ermittelt werden<sup>2)</sup>.

### III.

Bei Untersuchung einer Farbstofflösung hat man als charakteristische Konstanten die Werte der Lichtabschwächung (-auslöschung) in den Absorptionsbanden zu bestimmen. Sie werden definiert durch die Extinktionskoeffizienten, die sich aus der Formel berechnen :

$$\varepsilon = \frac{1}{c} \lg \left( \frac{J}{J'} \right);$$

darin bedeutet bei gegebener Schichtdicke (1 cm)  $c$  die Konzentration des gelösten Farbstoffes (in Gramm pro 1 ccm),  $J$

<sup>1)</sup> Vgl. J. M. Eder, l. c.; das gleiche Ergebnis findet auch Rosenberg (noch nicht publiziert).

<sup>2)</sup> Eine Arbeit, die sich mit dem Verhalten der photographischen Platte gegen Licht verschiedener Wellenlänge beschäftigt, wird augenblicklich von Herrn cand. Fulda in Tübingen auf der Sternwarte Oesterberg unternommen. Die hierbei erprobte und weiter unten beschriebene Versuchsanordnung haben wir direkt übernehmen können.

die Intensität des auffallenden,  $J_1$  die des austretenden Lichtes an gleicher Stelle des Spektrums. Auf der zur Lichtmessung dienenden photographischen Platte muß also das Spektrum der Lichtquelle sowohl direkt, als auch durch die zu untersuchende Farblösung hindurch aufgenommen sein, wobei vorausgesetzt wird, daß die Intensität der Lichtquelle und die Expositionszeit für beide Spektren die gleichen sind. Da die praktisch leicht zu beschaffenden Lichtquellen (elektrisches Licht, Gasglühlicht usw.) aber keine Gewähr dafür bieten, daß ihre Leuchtkraft während längerer Zeit als konstant betrachtet werden kann, so wird man auf den Gedanken verzichten müssen, die Aufnahmen nacheinander zu exponieren, sondern wird zweckmäßig die Spektren des auffallenden und durchtretenden Lichtes gleichzeitig aufnehmen, weil dann alle Intensitätsschwankungen der Lampe beide Spektren in gleicher Weise treffen.

Wir haben die Gleichzeitigkeit der Aufnahmen erreicht durch Anwendung einer Doppelcuvette, deren beide Kammern nur je die Hälfte des Spektrographenspaltcs bedeckten; diese Anordnung ist der Verwendung nur einer Cuvette, die den halben Spalt bedeckt, während die andere Hälfte frei bleibt, vorzuziehen, weil auf diese Weise die von den Glaswänden der Cuvette reflektierten und absorbierten Intensitätsbeträge, sowie die in dem Lösungsmittel absorbierte Intensität in die Messungen überhaupt nicht eingehen. Wir fanden jedoch, daß bei einer Konzentration der Blutlösung, die die beiden Streifen des Oxyhämoglobins am günstigsten hervortreten läßt, der Helligkeitsunterschied zwischen auffallendem und durchtretendem Licht so beträchtlich ist, daß die Schwärzungsunterschiede zwischen beiden Spektren für genaue photometrische Messungen zu groß werden; zeigte das Blutspektrum in den Absorptionstreifen die richtige mittlere Schwärzung, so war das Vergleichspektrum bis zur völligen Undurchsichtigkeit überexponiert, und zeigte das Vergleichspektrum die richtige Schwärzung, so war in der gleichen Zeit in den Blutbanden noch so wenig Silber reduziert, daß die Platte an diesen Stellen fast glasklar geblieben war.

Es erwies sich also als notwendig, das auffallende Licht für das Vergleichspektrum um einen für jede Wellenlänge genau angebbaren Betrag zu schwächen, um in beiden

Spektrale gut vergleichbare Schwärzungen zu erzielen. Wir haben diesen Zweck dadurch erreicht, daß wir vor der betreffenden Spalthälfte ein neutral gefärbtes Absorptionsglas anbrachten und dessen Absorptionskoeffizienten in dem auszumessenden Spektralgebiete bestimmten. Diese Werte wurden in einfacher Weise dadurch erhalten, daß eine direkte Aufnahme des Lampenlichtes (ohne Zwischenschaltung einer Cuvette) gemacht wurde, wobei die eine Hälfte des Spaltes völlig frei war, während das Absorptionsglas sich vor der anderen Hälfte befand. Die mit Hilfe der Schwärzungskurve in Helligkeitsdifferenzen umgesetzten Schwärzungsunterschiede zwischen den beiden so erhaltenen Spektren ergaben die Reduktion des abgeschwächten Vergleichspektrums auf die volle Intensität des auffallenden Lichtes.

In den meisten Fällen von Blutuntersuchungen wird es indes nicht möglich sein, die Größe  $\epsilon$  selbst zu bestimmen, da sich wohl die Konzentration der Blutlösung, aber nicht ohne weiteres die des Blutfarbstoffes ermitteln läßt, und da auch der exakten Ermittlung der Schichtdicken experimentelle Schwierigkeiten entgegenstehen können. Immer ermitteln läßt sich dagegen die Größe  $\lg \left( \frac{J}{J_1} \right)$ , die gleich  $\epsilon \cdot C$  ist, wo  $C$  eine Konstante bedeutet, die gleich dem Quotienten  $\frac{\text{Konzentration}}{\text{Schichtdicke}}$  ist.

Die Größe  $\lg \left( \frac{J}{J_1} \right)$  ist also für alle Wellenlängen dem Extinktionskoeffizienten proportional; und nur auf diese Größe kommt es an, wenn man sich auf die Feststellung des Verhältnisses  $\frac{\epsilon_1}{\epsilon_2}$  für zwei verschiedene Wellenlängen beschränkt, wie dies von Hüfner u. a. zur Charakterisierung des Blutfarbstoffes geschehen ist.

#### IV.

Unsere Aufnahmen zerfielen in zwei völlig verschiedene Teile, deren erster der Gewinnung der nötigen Schwärzungen zur Konstruktion der Schwärzungskurve gewidmet war, während der zweite die Fixierung der Blutspektren mit den nötigen Vergleichspektren umfaßte.

Als messendes Prinzip zur Erzielung verschiedener Intensitäten wandten wir eine Entfernungsänderung zwischen der Lichtquelle und der photographischen Platte an<sup>1)</sup>. Da die Aufnahmen also nacheinander gemacht werden mußten, konnte

<sup>1)</sup> Die im folgenden zur Erlangung von Schwärzungskurven für Licht von bestimmter Wellenlänge beschriebene Methode entspricht der Anordnung von Herrn cand. Fulda.



für diesen Zweck nur eine während längerer Zeiträume absolut konstante Lichtquelle in Frage kommen. Sehr gut geeignet ist für diesen Zweck die zum Scheinerschen Sensitometer gehörige Benzinkerze<sup>1)</sup>, die während vieler Stunden eine hervorragende Konstanz bewahrt. Die Entfernungen zwischen Platte und Lichtquelle, die auf der optischen Bank bis auf 0,5 mm genau eingestellt wurden, waren so berechnet, daß die logarithmische Helligkeitsdifferenz zweier benachbarter Stellungen genau gleich 0,400 wurde; dabei mußte auch berücksichtigt werden, daß bei verschiedenen Entfernungen auch verschieden große Teile der Flamme durch das Diaphragma der Benzinkerze hindurch auf einen Punkt der Platte einwirken. Eine Korrektions-tabelle, die diesem Einfluß Rechnung trägt, ist von Schwarzschild<sup>2)</sup> berechnet worden. Die definitiven Abstände zwischen Lampe und Platte betragen 1000, 634,5 und 403 mm.

Um gleichzeitig durch eine einzige Exposition eine große Anzahl von Schwärzungen zu erzielen, wurde dicht vor der Platte eine photographische Schwärzungsskala vorgeschaltet, die mit Hilfe des Scheinerschen Sensitometers, und zwar mit der von Eder eingeführten Scheibe mit eckigen Ausschnitten erzeugt worden war. Die Schwärzungen gingen dabei über 20 Felder, von denen das schwächste glasklar geblieben war, in sukzessiver Steigerung bis zu fast völliger Undurchsichtigkeit. Die Skala war ca. 10 mm breit und 90 mm lang und befand sich vor einer Blende mit entsprechend geformtem Ausschnitt, hinter der sich die Kassette verschieben ließ; es wurden stets drei Aufnahmen in den angegebenen Entfernungen und bei gleicher Expositionszeit gemacht und nach jeder Exposition die Kassette um die volle Breite des Ausschnittes hinter der Blende verschoben<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Vgl. Zeitschr. f. Instrumentenkunde 1894, Heft 6; ferner Eder, System der Sensitometrie, II. Abhandlung (Sitzungsber. d. Wien. Akad., Math.-naturwiss. Kl. 109, Abt. IIa, 1900).

<sup>2)</sup> Publ. d. v. Kuffnerschen Sternwarte in Wien 5, 20, 1900.

<sup>3)</sup> Natürlich muß bei dieser Anordnung für absolute Verfinsterung des Beobachtungsraumes gegen äußeres Licht und Vermeidung von Reflexen der Benzinlampe an den Wänden gesorgt werden. Bei Anwendung rotempfindlicher Platten muß auch der Rubinglaszylinder der Lampe mit einem vollständig undurchsichtigen Überzylinder versehen werden, der nur zwei Ausschnitte zum Durchlassen des aus dem Diaphragma austretenden Lichtes und zur Kontrollierung der Flammenhöhe besitzt.

Wie bereits oben erwähnt, ist für spektralphotometrische Untersuchungen die Erzeugung der Schwärzungskurve durch weißes Licht aber nicht ohne weiteres zulässig, sondern streng genommen müßte für jede Wellenlänge eine besondere Schwärzungskurve konstruiert werden. Bei unseren Blutuntersuchungen interessierte uns speziell das Spektralgebiet zwischen  $\lambda$  510  $\mu\mu$  und 600  $\mu\mu$ , das die beiden Hauptstreifen des Oxyhämoglobins enthält. Da das ganze Gebiet nicht sehr ausgedehnt ist und sich die Gradation der Platte nur langsam und jedenfalls stetig mit der Wellenlänge zu ändern scheint, so wird es erlaubt sein, für dieses ganze Spektralgebiet eine einzige der mittleren Wellenlänge angehörige Schwärzungskurve zu benutzen. Die Absonderung der gewünschten Strahlung kann dabei durch spektrale Zerlegung erfolgen, wie dies in den als Monochromaten bezeichneten Instrumenten geschieht, oder auch durch geeignete Lichtfilter. Dieses letzte Verfahren empfiehlt sich besonders wegen seiner bequemen Anwendung und der denkbar größten Vereinfachung des Instrumentariums.

Besonders geeignet sind die von der Firma Wratten and Wainwright, Limited, Croydon (England) in den Handel gebrachten Monochromatic filters, die allen Ansprüchen an Isolierung eines engen, scharf begrenzten Spektralgebietes genügen. Der ganze Satz umfaßt 7 Filter, deren Durchlässigkeitsgebiete vom äußersten Rot sukzessive bis ins Ultraviolett übergehen. Für unsere Zwecke schien das von der Firma mit  $\epsilon$  bezeichnete Filter am besten zu passen, dessen Durchlässigkeitszone etwa zwischen 510 und 550  $\mu\mu$  liegt, also sehr nahe mit dem Spektralgebiete der Oxyhämoglobinstreifen übereinstimmt.

Ein solches schalteten wir also vor das Diaphragma unserer Lampe bei den Aufnahmen, die uns die Schwärzungen zur Konstruktion der Schwärzungskurven lieferten.

Zur Erzeugung der Blutspektren diente uns ein Gitterspektrograph mit horizontalem Spalt und einer Gitterkopie von Thorp<sup>1)</sup>; als Lichtquelle benutzten wir eine 50kerzige Nernstlampe (0,5 Amp., 220 Volt), von der die Überglocke entfernt war. Zur Erzielung eines gleichmäßigen Lichtbüschels war

---

<sup>1)</sup> Bezugsquelle: Spindler & Hoyer in Göttingen.

zwischen Spalt und Lichtquelle eine Beleuchtungslinse von 18 cm Brennweite eingeschaltet, in deren einem Brennpunkt sich der Faden des Nernstbrenners befand. Von dem Spalt war die Linse 4 cm entfernt.

Für die Cuvette war ein Tischohen mit festem Anschlag hergerichtet worden, so daß ihre Vorderwand stets 1,0 cm vor dem Spalt und diesem parallel stand. Die lichte Weite (Schichtdicke) der aus farblosem Glas hergestellten planparallelen Doppeltcuvette betrug in der Richtung der Lichtstrahlen rund 21 mm, die Stärke ihrer Wände 2 mm. Um die Schichtdicke verändern zu können, hatten wir 3 Blöcke aus planparallelem Glas zum Einsetzen in die eine Cuvette herstellen lassen. Die uns damit zugänglichen 4 Schichtdicken betragen genau: 20,954, 10,955, 5,955, 0,961 mm. Vor der einen Hälfte des Spaltes befand sich das oben erwähnte neutrale Absorptionsglas, das wir aus einer photographischen Platte von geeigneter Schwärzung herausgeschnitten hatten; die Spaltweite betrug bei allen Aufnahmen 0,05 mm.

Die Kassette des Spektrographen — eingerichtet für das Plattenformat 13/18 cm — ließ sich hinter einer schlitzförmigen Blende senkrecht zur Längsausdehnung der Spektra verschieben, so daß eine größere Anzahl Spektra von der Breite der voll ausgenutzten Spalthöhe untereinander erhalten wurden. Zur Fixierung der Wellenlänge diente eine mit dem Spektrographen fest verbundene Marke dicht vor der Kassette, so daß durch unsichere Kassettenführung hervorgebrachte Fehler keinen Einfluß auf die Bestimmung der Wellenlänge ausüben konnten. Die Wellenlänge der Marke selbst und die Dispersionskurve des Spektrographen wurde aus einer Aufnahme des Sonnenspektrums im Anschluß an die Fraunhoferschen Linien ermittelt.

Zur Verdünnung des Blutes wurde stets 0,1%ige Sodalösung benutzt; die für photographische Aufnahmen günstigste Sättigung der Farbe fanden wir, wenn das Produkt Schichtdicke  $\times$  Konzentration (an Blut!) etwa gleich 0,01 cm wurde (Also bei Benutzung der Cuvette von 21 mm lichter Weite eine Verdünnung von ca. 0,5:100.) Die zur hinreichenden Durchexponierung der Absorptionsstreifen erforderliche Belichtungszeit betrug für unsere Nernstlampe 40 Sek.

Wir benutzten zu unseren Untersuchungen stets die panchromatischen Spektrumplatten von Wratten and Wainwright, Limited, Croydon, England. Die Platten besitzen bis weit ins Rot hinein eine hohe Empfindlichkeit und müssen daher in vollständiger Dunkelheit in die Kasette gelegt, entwickelt und fixiert werden. Entwickelt wurde stets mit Rodinal 1:15 bei 16° ca. 5 Min. lang, fixiert im sauren Fixierbade.

#### V. Vollständiges Rechenbeispiel<sup>1)</sup>.

10. X. 11 Tübingen. 3 gesunden Kaninchen wurde aus der Carotis Blut entnommen und mit sorgfältig gereinigten Granaten defibriniert. Die näheren Daten enthält folgende Tabelle.

Tier	Gewicht kg	Zeit der Blut- entnahme
Kaninchen 1	2,7	10 <sup>h</sup> 40 <sup>m</sup> vorm.
" 2	3,2	11 <sup>h</sup> 00 <sup>m</sup>
" 3	2,6	11 <sup>h</sup> 15 <sup>m</sup> "

Ferner wurde im Tübinger Schlachthaus von seeben geschlachteten Tieren eine Hammelblutprobe um 2<sup>h</sup> 55<sup>m</sup> und eine Schweineblutprobe um 3<sup>h</sup> 4<sup>m</sup> nachmittags gewonnen und in gleicher Weise defibriniert.

Das Blut wurde mit 0,1%iger Sodalösung möglichst genau in dem weiter unten angegebenen Verhältnis verdünnt. Eine einzige Probe (Platte 2e) wurde zunächst mit dem 10fachen Volumen einer Lösung von 0,1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 1% NaNO<sub>2</sub> versetzt, damit Methämoglobin erzeugt würde, danach erst mit der 0,1%igen Sodalösung weiter verdünnt. Die Daten für die einzelnen Aufnahmen finden sich in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Die Aufnahmen Ig und II f fanden ohne Vorsetzung der Cuvette statt zur Bestimmung des Lichtverlustes in dem Absorptionsglas vor der einen Hälfte des Spaltes. Die Cuvettenkammer, die vor dieser Spalthälfte stand, war stets mit 0,1%iger Sodalösung gefüllt.

<sup>1)</sup> Bei Gewinnung der Blutarten, Herstellung der Lösungen usw. standen uns die Hilfsmittel des Pharmakologischen Instituts in Tübingen zur Verfügung. Für dies freundliche Entgegenkommen sind wir Herrn Carl Jacobj zu großem Danke verpflichtet.

Platten-Nr.	Aufnahme	Expositionszeit	Tier	Lösungsmittel	Verdünnung	Schichtdicke mm
I	a	11 <sup>h</sup> 56 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	Kaninchen 3	0,1% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,459:100	20,954
I	b	12 <sup>h</sup> 3 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	" 1	" "	0,459:100	20,954
I	c	12 <sup>h</sup> 10 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	" 2	" "	0,459:100	20,954
I	d	12 <sup>h</sup> 20 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	" 2	" "	0,807:50	5,955
I	e	12 <sup>h</sup> 36 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	" 2	" "	2,00:20	0,961
I	f	3 <sup>h</sup> 35 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	Hammel	" "	0,459:100	20,954
I	g	12 <sup>h</sup> 38 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 10 <sup>s</sup>	—	—	—	—
II	a	12 <sup>h</sup> 54 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	Kaninchen 2	0,1% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,00:20	0,961
II	b	12 <sup>h</sup> 58 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	" 2	" "	0,459:100	20,954
II	c	3 <sup>h</sup> 37 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	Hammel	" "	0,459:100	20,954
II	d	3 <sup>h</sup> 46 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	Schwein	" "	0,459:100	20,954
II	e	4 <sup>h</sup> 15 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 40 <sup>s</sup>	Kaninchen 2	0,1% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 0,05% NaNO <sub>2</sub>	0,459:100	20,954
II	f	4 <sup>h</sup> 20 <sup>m</sup> 0 <sup>s</sup> — 10 <sup>s</sup>	—	—	—	—

Außerdem befanden sich auf jeder Platte noch die drei Schwärzungsskalen, die nach der oben angegebenen Weise mit der Benzinkerze und Filter  $\epsilon$  in den drei verschiedenen Distanzen exponiert wurden. Diese Schwärzungsskalen wollen wir mit  $I_\alpha$ ,  $I_\beta$ ,  $I_\gamma$  resp.  $II_\alpha$ ,  $II_\beta$ ,  $II_\gamma$  bezeichnen.

Zunächst sei an dem vollständigen Beispiel von Platte I<sup>1</sup> gezeigt, auf welche Weise die Schwärzungskurve gewonnen wird<sup>1)</sup>

Tabelle I.

Nr.	$S_\alpha$	Diff.	$S_\beta$	Diff.	$S_\gamma$	$\lg J_\alpha$	$\lg J_\beta$	$\lg J_\gamma$
1	58,3	10,9	47,4	11,4	36,0	2,119 + 0,004	1,715 — 0,002	1,317
2	57,3	11,5	45,8	11,0	34,8	2,046 — 14	1,860 + 1	1,259
3	56,9	12,2	44,7	10,8	33,9	2,025 + 1	1,824 + 12	1,212
4	56,1	12,4	43,7	10,2	33,5	1,991 — 3	1,594 + 4	1,190
5	55,1	13,0	42,1	9,2	32,9	1,954 + 8	1,546 — 8	1,154
6	53,5	12,9	40,6	8,7	31,9	1,901 + 1	1,500 + 18	1,082
7	49,4	11,5	37,9	7,0	30,9	1,778 — 22	1,400 + 9	0,991
8	46,6	11,1	35,5	5,2	30,3	1,687 — 5	1,292 — 27	0,919
9	42,7	9,4	33,3	3,9	29,4	1,564 — 14	1,178 + 0,020	0,758
10	39,3	7,6	31,7	2,6	29,1	1,454 — 13	1,067	
11	35,7	5,7	30,0	1,4	28,6	1,302 + 28	0,874	
12	32,8	3,6	29,2			1,148 + 0,030	0,718	
13	30,2	1,6	28,6			0,906		
14	28,9							

In Tabelle I finden sich in der ersten Kolumne die Zahlen, die den aufeinanderfolgenden Schwärzungsfeldern der Skala entsprechen, unter  $S_\alpha$ ,  $S_\beta$  und  $S_\gamma$  die Mittelwerte der Keil-

<sup>1)</sup> Siehe Tafel IV.

ablesungen am Hartmannschen Mikrophotometer, die dem entsprechenden Schwärzungsfeld zugehören.

Dazwischen sind unter der Überschrift „Diff.“ die Differenzen  $S_\alpha - S_\beta$  resp.  $S_\beta - S_\gamma$  angegeben. Wir wissen also, daß dieser Schwärzungszuwachs einer Vermehrung der Helligkeitslogarithmen um 0,400 entspricht.

Zunächst haben wir die Differenzen  $S_\alpha - S_\beta$  und  $S_\beta - S_\gamma$  als Funktion der  $S_\beta$  resp.  $S_\gamma$  auf Millimeterpapier dargestellt und durch eine Kurve ausgeglichen (Gradationskurve).

Aus dieser Kurve wurden dann für eine ganze Anzahl Schwärzungen  $S$  die einem Zuwachs des Helligkeitslogarithmus um 0,400 entsprechenden Schwärzungen  $S'$  abgelesen. Der Anblick der Kurve zeigte, daß sie sich für die Schwärzungen  $S$  von 31,5 bis 33,5 sehr eng einer Geraden anschmiegte, und so wurden diese beiden Punkte zur Bestimmung der tangierenden Geraden benutzt. Den Schwärzungen  $S_1 = 33,5$ ;  $S_2 = 31,5$ ;  $S_1' = 43,5$ ;  $S_2' = 39,3$  entsprechen die Konstanten  $b = 2,1$  und  $a = 24,45$ . Die Formel zur Umwandlung der Schwärzungen in Helligkeitslogarithmen lautet also

$$\lg J^* = 0,400 \cdot \frac{\lg(S - 24,45)}{\lg(2,1)}.$$

Wir haben  $\lg J$  hier mit einem Asterisk gekennzeichnet, weil die Werte noch nicht die definitiven sind, sondern es erst durch eine Korrektur für die Abweichungen der Gradationskurve von der Geraden werden.

Tabelle II.

$S$	$S'$	$S - a$	$S' - a$	$\lg(S - a)$	$\lg(S' - a)$	$\lg J^*$	$\lg J'^*$	$\lg J$	$\lg J'$
29,0	31,8	4,55	7,35	0,658	0,866	0,817 - 142	1,075 0	0,675	1,075
30,0	35,2	5,55	10,75	0,744	1,031	0,925 - 45	1,280 0	0,880	1,280
31,0	38,0	6,55	13,55	0,816	1,132	1,012 - 7	1,405 0	1,005	1,405
31,5	39,3	7,05	14,85	0,848	1,172	1,054 0	1,454 0	1,054	1,454
33,5	43,5	9,05	19,05	0,957	1,280	1,188 0	1,588 0	1,188	1,588
35,0	46,1	10,55	21,65	1,023	1,336	1,270 0	1,660 + 10	1,270	1,670
37,0	49,0	12,55	24,55	1,099	1,390	1,364 0	1,725 + 39	1,364	1,764
39,0	51,6	14,55	27,15	1,163	1,434	1,445 0	1,780 + 65	1,445	1,845
41,0	53,9	16,55	29,45	1,219	1,469	1,513 0	1,824 + 89	1,513	1,913
43,0	55,6	18,55	31,15	1,268	1,494	1,574 0	1,854 + 120	1,574	1,974
45,0	57,0	20,55	32,55	1,313	1,513	1,630 0	1,878 + 152	1,630	2,030
47,0	58,0	22,55	33,55	1,353	1,526	1,680 + 19	1,895 + 204	1,699	2,099
48,0	58,5	23,55	34,05	1,372	1,532	1,704 + 30	1,901 + 233	1,734	2,134

$$a = 24,45; b = 2,1.$$

Alle Werte für Platte I sind in der Tabelle II zusammengestellt. Zunächst sehen wir, daß die zu den Schwärzungen  $S = 31,5$   $S' = 39,3$  und  $S = 33,5$   $S' = 43,5$  gehörenden  $\lg J^*$  und  $\lg J'^*$  sich tatsächlich um 0,400 unterscheiden, wie verlangt wird, und schließen gleichzeitig, daß die Beziehungen zwischen Schwärzung und Helligkeitslogarithmus in dem Gebiet von  $\lg J^* = 1,054$  bis 1,588 streng richtig sind. Werte, die kleiner oder größer sind, werden dann einfach in der Weise korrigiert, daß man von dem korrespondierenden Wert, solange er noch in dem obenerwähnten Gebiet liegt, 0,400 abzieht resp. addiert. Auf diese Weise sind die in Tabelle II angegebenen Korrekturen berechnet. Kommt man zu Wertepaaren, wo beide  $\lg J^*$  außerhalb der obenerwähnten Werte liegen, so sind inzwischen die Korrekturen wenigstens für Werte in der Nachbarschaft des einen der beiden Helligkeitslogarithmen gefunden, so daß man durch einfache — ev. graphische — Interpolation die neuen Korrekturen bestimmen kann. Und so schreitet man sukzessive fort, bis alle Intensitätslogarithmen korrigiert sind.

Die so korrigierten Helligkeitslogarithmen sind in Tabelle II in den beiden letzten Spalten zusammengestellt. Trägt man jetzt die so gefundenen  $\lg J$  und  $\lg J'$  als Funktion von  $S$  und  $S'$  auf Millimeterpapier auf, so stellt die dadurch festgelegte Kurve die Schwärzungskurve der Platte dar.

Die den Tabellen I und II entsprechenden Werte für Platte II sind in den Tabellen III und IV zusammengestellt.

Mit den auf diese Weise erhaltenen Schwärzungskurven haben wir sämtliche gemessenen Schwärzungen auf beiden Platten in Helligkeitslogarithmen umgesetzt und zunächst die durch das Absorptionsglas verursachte Extinktion bestimmt. Zu diesem Zweck befindet sich auf jeder Platte eine Aufnahme des Spektrums der Nernstlampe, die mit halb unverdecktem, halb durch das Absorptionsglas verdecktem Spalt erzielt worden ist<sup>1)</sup>. In beiden Spektren wurden auf beiden Hälften Schwärzungen an fünf verschiedenen Wellenlängen gemessen, die sich gleichmäßig über das ganze zu untersuchende Spektralgebiet verteilen.

<sup>1)</sup> Siehe Tafel IV g.

Tabelle III.

Nr.	$S_\alpha$	Diff.	$S_\beta$	Diff.	$S_\gamma$	$\lg J_\alpha$	$\lg J_\beta$	$\lg J_\gamma$
1	56,5	9,4	47,1	11,0	36,1	2,164 + 0,008	1,756 + 0,010	1,346
2	56,1	10,2	45,9	10,8	35,1	2,118 + 4	1,714 + 19	1,295
3	55,4	10,8	44,6	9,8	34,8	2,063 - 6	1,669 - 10	1,279
4	54,8	11,5	43,3	9,4	33,9	2,032 + 5	1,627 - 2	1,229
5	53,6	11,6	42,0	8,8	33,2	1,986 + 3	1,583 - 2	1,185
6	52,4	11,4	41,0	8,1	32,9	1,947 - 2	1,549 - 16	1,165
7	49,3	11,0	38,3	6,8	31,5	1,835 - 11	1,446 - 10	1,056
8	46,6	10,6	36,0	5,5	30,5	1,739 - 3	1,342 - 2	0,944
9	43,5	9,7	33,8	3,8	30,0	1,633 + 9	1,224 - 22	0,846
10	40,4	8,2	32,2	2,3	29,9	1,527 + 14	1,113 - 0,109	(0,822)
11	37,0	6,4	30,6			1,389 + 30	0,959	
12	33,1	3,4	29,7			1,178 + 6	0,772	
13	30,8	1,7	29,1			0,984 + 0,034	(0,550)	
14	29,8					0,797		
15	29,1							

Tabelle IV.

$S$	$S'$	$S-a$	$S'-a$	$\lg(S-a)$	$\lg(S'-a)$	$\lg J^*$	$\lg J'^*$	$\lg J$	$\lg J'$
29,0	30,3	4,14	5,44	0,617	0,736	0,792 - 283	0,944 - 35	0,509	0,909
29,5	32,2	4,64	7,34	0,667	0,866	0,856 - 145	1,111 0	0,711	1,111
30,0	34,2	5,14	9,34	0,711	0,970	0,912 - 66	1,246 0	0,846	1,246
30,5	36,0	5,64	11,14	0,751	1,047	0,964 - 15	1,349 0	0,949	1,349
31,0	37,3	6,14	12,44	0,788	1,095	1,011 - 6	1,405 0	1,005	1,405
31,5	38,5	6,64	13,64	0,822	1,135	1,057 0	1,457 0	1,057	1,457
33,5	42,6	8,64	17,74	0,937	1,249	1,204 0	1,604 0	1,204	1,604
34,0	43,5	9,14	18,64	0,961	1,270	1,233 0	1,629 + 4	1,233	1,633
34,5	44,4	9,64	19,54	0,984	1,291	1,262 0	1,657 + 5	1,262	1,662
35,0	45,3	10,14	20,44	1,006	1,311	1,291 0	1,682 + 9	1,291	1,691
35,5	46,0	10,64	21,14	1,027	1,325	1,318 0	1,700 + 18	1,318	1,718
36,0	46,7	11,14	21,84	1,047	1,339	1,343 0	1,718 + 25	1,343	1,743
37,0	47,9	12,14	23,04	1,084	1,363	1,380 0	1,750 + 30	1,380	1,780
39,0	50,3	14,14	25,44	1,150	1,406	1,476 0	1,804 + 72	1,476	1,876
41,0	52,5	16,14	27,64	1,208	1,442	1,550 0	1,850 + 100	1,550	1,950
43,0	54,5	18,14	29,64	1,259	1,472	1,615 + 2	1,889 + 128	1,617	2,017
45,0	55,7	20,14	30,84	1,304	1,489	1,674 + 7	1,911 + 170	1,681	2,081
47,0	56,4	22,14	31,54	1,345	1,499	1,727 + 26	1,924 + 229	1,753	2,153
48,0	56,6	23,14	31,74	1,364	1,502	1,750 + 30	1,926 + 254	1,780	2,180

$$\alpha = 24,86; \quad b = 2,05.$$

In Tabelle V sind die verschiedenen Daten enthalten. Die erste Kolumne zeigt die Wellenlängen in Ångström-Einheiten (1 A.-E. = 0,1  $\mu\mu$ ), dann folgen die Schwärzungen, Helligkeitslogarithmen und deren Differenz, die die Extinktion in dem Absorptionsglas darstellt. Da sich kein Gang mit der Wellenlänge in den Differenzen  $\lg J' - \lg J$  zeigt, so sind wir berechtigt, die verschiedenen Werte zu Mittelwerten zu ver-



einigen und erhalten für Platte I  $0,844 \pm 0,004$  w. F.; für Platte II  $0,871 \pm 0,005$  w. F. Die innere Genauigkeit ist eine sehr große<sup>1)</sup>.

Tabelle V.

$\lambda$	Platte I					Platte II				
	$S$	$S'$	$\lg J$	$\lg J'$	$\lg J' - \lg J$	$S$	$S'$	$\lg J$	$\lg J'$	$\lg J' - \lg J$
5133	30,1	48,2	0,895	1,737	0,842	30,7	49,3	0,972	1,834	0,862
5338	30,9	51,1	0,986	1,828	0,842	31,6	52,3	1,065	1,943	0,878
5544	30,8	49,0	0,912	1,766	0,854	30,9	50,3	0,995	1,873	0,878
5749	30,7	50,4	0,969	1,808	0,839	31,3	51,3	1,037	1,909	0,872
5956	zu schwach	46,6				30,3	47,6	0,909	1,772	0,863

Auf genau die gleiche Weise wurde die Extinktion des Lichtes in den beiden Glasblöcken bestimmt, die die Schichtdicke von 20,954 mm auf 5,955 und 0,961 mm verringern, indem vor die eine Hälfte des Spaltes die Cuvette mit dem Lösungsmittel, vor die andere Hälfte die Cuvette mit Lösungsmittel und Glasblock darin gesetzt wurde. Das Absorptionsglas war für diesen Zweck natürlich entfernt worden. Es ergab sich der Lichtverlust in Helligkeitslogarithmen:

Für Glasblock I (19,993 mm dick) zu  $0,016 \pm 0,002$  w. F.

„ „ II (14,999 „ „ ) „  $0,017 \pm 0,005$  w. F.

Die vollständige Gleichheit für beide Glasblöcke zeigt, daß es sich nicht um Absorption handelt, die für die verschiedenen Glasdicken verschieden sein mußte, sondern um einen reinen Reflexionsverlust. Das durch Absorption verloren gegangene Licht ist unmeßbar gering für die in Frage kommenden Wellenlängen.

Nachdem wir so die nötigen Konstanten ermittelt hatten, haben wir sämtliche Blutspektren in Abständen von 0,4 zu 0,4 mm (= 17 A.-E.), die Vergleichspektren von 0,8 zu 0,8 mm durchphotometriert. Die Resultate finden sich in den im Anhang befindlichen Tabellen in extenso zusammengestellt. Der Reihe nach enthalten dort die einzelnen Kolumnen: 1. die Wellenlänge in A.-E.; 2. die gemessene Schwärzung im Vergleichspektrum; 3. diese mit Hilfe der Schwärzungskurve in Helligkeitslogarithmen umgesetzte Schwärzung; 4. einen durch graphische Ausgleichung für jede Wellenlänge abgeleiteten mittleren Wert dieser Helligkeitslogarithmen, vermehrt um die

<sup>1)</sup> Vgl. S. 369.

Extinktion des Absorptionsglases; 5. die Schwärzung im Blutspektrum; 6. den dazu gehörigen Helligkeitslogarithmus und 7. den Logarithmus für das Verhältnis: auffallendes Licht dividiert durch austretendes Licht beim Blutspektrum. Die

in der 7. Kolumne befindlichen  $\lg\left(\frac{J_1}{J_2}\right)$  sind der besseren Übersicht wegen graphisch dargestellt worden, und befinden sich auf Tafel II und III des Anhangs. Ferner haben wir geglaubt, auch die direkte Kopie einer unserer Platten mit publizieren zu müssen (Tafel IV), da auf diese Weise das Wesen der photographischen Methode besser erkannt werden kann.

## VI. Resultate<sup>1)</sup>.

### A. Fehlergrenzen.

Das von uns gewonnene Zahlenmaterial erlaubt trotz seines geringen Umfanges doch eine vorläufige Abschätzung der Leistungsfähigkeit und der Grenzen unserer Methode.

Zunächst wäre zu untersuchen, wie genau eine Schwärzungskurve das Material, aus dem sie gewonnen ist, selbst darstellt. Zu diesem Zweck haben wir die  $S_\alpha$ ,  $S_\beta$ ,  $S_\gamma$  aus Tabelle I (S. 363) in Helligkeitslogarithmen umgewandelt; wenn alle Beobachtungen streng richtig wären, so müßte die Differenz der zueinandergehörigen  $\lg J_\alpha$  und  $\lg J_\beta$  resp. der  $\lg J_\beta$  und  $\lg J_\gamma$  überall genau gleich 0,400 sein. Infolge der stets vorhandenen Beobachtungsfehler werden die Differenzen aber von 0,400 abweichen, und gerade die Größe dieser Abweichungen wird uns ein Maß für die Genauigkeit unserer Beobachtungen abgeben. Diese  $\lg J_\alpha$ ,  $\lg J_\beta$ ,  $\lg J_\gamma$  sowie die Abweichungen der einzelnen Differenzen von 0,400 sind nun ebenfalls in Tabelle I zusammengestellt. Ein Blick über die Größe und den Gang der Differenzen zeigt, daß die Messungen eine durchaus befriedigende Genauigkeit besitzen. Der Vorzeichenwechsel deutet auf keinerlei systematischen Gang hin. Der nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnete wahrscheinliche Fehler einer

<sup>1)</sup> Wir müssen uns darauf beschränken, das hier vorliegende, geringe Material zu publizieren, da eine weitere Ausdehnung der Untersuchungen — wie wir sie ursprünglich beabsichtigt hatten — infolge unserer räumlichen Trennung voraussichtlich in absehbarer Zeit nicht möglich sein wird.

Differenz stellt sich auf  $\pm 0,010$ , oder wenn man die Schwärzungswerte unter 30,0 unberücksichtigt läßt, da hier die Schwärzungskurve bereits sehr flach verläuft, sogar nur auf  $\pm 0,007$ . Für Platte II wird der w. F. einer Differenz mit Benutzung aller Werte gleich  $\pm 0,010$ , bei Fortlassung der Schwärzungen unter 30,0 gleich  $\pm 0,009$  (vgl. Tabelle III, S. 366).

Ein ähnliches Resultat liefert uns die Betrachtung der Tabelle V (S. 367): die dort angegebenen Werte für  $S$  und  $S'$  stellen jeder das Mittel aus vier einzelnen, voneinander unabhängigen Messungen dar; die Werte  $\lg J' - \lg J$  gelten für die Lichtauslöschung in einer Bromsilbergelatine-Platte, also in einer für optische Strahlen so gut wie farblosen und für längere Zeiträume als unveränderlich anzusehenden Substanz. Für diese Größe finden wir als Mittelwert aus Platte I 0,844, aus Platte II 0,871. Betrachten wir zunächst jede Platte für sich, so ergibt sich für Platte I aus den Abweichungen der Einzelwerte vom Mittel der innere zufällige mittlere Fehler dieser Größe zu  $\pm 0,0065$ , und ebenso für Platte II zu  $\pm 0,0078$ . Nach den Untersuchungen von Fechner und anderen gilt als äußerste Grenze für einen unter den günstigsten äußeren Bedingungen von dem menschlichen Auge gerade noch wahrnehmbaren Helligkeitsunterschied 1 Prozent oder in Helligkeitslogarithmen ausgedrückt, 0,0043. Man sieht, daß der innere zufällige mittlere Fehler einer Platte diese Grenze fast erreicht, daß also die innere Genauigkeit einer Platte, verglichen mit optischen photometrischen Messungen, eine ganz hervorragende ist.

Etwas größere Differenzen findet man zwischen den aus verschiedenen Platten ermittelten Werten. Das Mittel aus beiden Platten ergibt 0,857, die Abweichungen der Einzelmittel von dieser Zahl betragen  $\pm 0,013$ , also etwa das Dreifache eines optisch gerade noch wahrnehmbaren Helligkeitsunterschiedes; der mittlere Fehler aus allen 9 Werten ergibt sich zu  $\pm 0,0156$ . Die Übereinstimmung ist auch hier als durchaus befriedigend zu bezeichnen. Wenn wir uns trotzdem entschlossen haben, jede Platte mit dem ihr zugehörigen Mittelwert und nicht mit dem Mittel aus beiden Platten, das vielleicht dem wahren Wert näher kommt, zu reduzieren, so hat dies seinen Grund darin, daß eben die innere Genauigkeit einer Platte noch wesent-

lich höher ist, als die Genauigkeit des aus verschiedenen Platten ermittelten Resultates. Wir sind der Ansicht, daß die sich für verschiedene Platten ergebenden Unterschiede systematischer Natur sind, vielleicht hervorgerufen durch eine bei der Konstruktion der Schwärzungskurven nicht völlig zu vermeidende Willkür in der Lage der Gradationskurve, und daß daher alle Messungen einer Platte in ähnlicher Weise beeinflusst sind. Eine Verwendung des Mittelwertes aus mehreren Platten würde daher die Resultate in keiner Weise verbessern können.

Da wir die in den Tabellen angegebenen Werte nur je einmal gemessen, zum Teil sogar jeden zweiten Wert nur interpoliert haben, so haben wir dort die gleiche Genauigkeit nicht erreicht. In der Tat finden wir in den Tabellen, die die Werte  $\lg \left( \frac{J_1'}{J_2'} \right)$  für je 2 Aufnahmen ein und derselben Blutlösung enthalten (Ic und IIb, Ie und IIa, If und IIc), Differenzen zwischen korrespondierenden Wertepaaren bis zu 0,08, in Ausnahmefällen sogar noch höhere, während allerdings die meisten Doppelwerte weit besser übereinstimmen. Ein gewisser Ausgleich der zufälligen Fehler wird natürlich erreicht, wenn man nicht die Einzelwerte, sondern Mittel aus einigen benachbarten Werten miteinander vergleicht. Die nachstehende Tabelle VI gibt eine Übersicht solcher Durchschnittswerte für die genannten Spektrenpaare in 4 ausgezeichneten Spektralgebieten.

Tabelle VI.

$\lambda$	$\lg \left( \frac{J_1'}{J_2'} \right)$ für Spektrum		Diffe- renz Ic-IIb	$\lg \left( \frac{J_1'}{J_2'} \right)$ für Spektrum		Diffe- renz Ie-IIa	$\lg \left( \frac{J_1'}{J_2'} \right)$ für Spektrum		Diffe- renz If-IIc
	Ic	IIb		Ie	IIa		If	IIc	
5099 } 5116 } 5133 }	0,441	0,431	+ 0,010	0,428	0,422	+ 0,006	0,485	0,458	+ 0,027
5390 } 5407 } 5424 }	1,263	1,238	+ 0,025	1,211	1,261	- 0,050	1,257	1,272	- 0,015
5578 } 5595 } 5613 }	0,777	0,779	- 0,002	0,741	0,772	- 0,031	0,783	0,792	- 0,009
5749 } 5766 }	1,303	1,295	+ 0,008	1,230	1,265	- 0,035	1,321	1,288	+ 0,033

Vorzeichenwechsel und Vorzeichenfolge in den Differenzen sind befriedigend. Die Größe der Fehler ist bei dieser Art der Zusammenstellung kaum beträchtlicher, als in Tabelle V, wo jeder Einzelwert durch mehrfache Messungen bestimmt wurde; der mittlere Fehler der Größen  $\lg\left(\frac{J_1}{J}\right)$  ergibt sich aus den obigen Zahlen zu  $\pm 0,0186$ .

Da es sich in vielen Fällen nur um eine Bestimmung des Absorptionskoeffizienten oder des Faktors  $\lg\left(\frac{J'}{J}\right)$  in wenigen ausgezeichneten Spektralgebieten handeln wird, so können diese wenigen Werte ohne großen Zeitaufwand mehrfach gemessen und daher mit entsprechend größerer Genauigkeit bestimmt werden.

#### B. Farbe des Blutes bei verschiedener Konzentration.

Die Aufnahmen Ic, Id, Ie, IIa, IIb, zu denen uns ein und dasselbe Blut, nur in verschiedener Verdünnung, diente, haben wir ausgeführt im Hinblick auf die Angaben von Manchot<sup>1)</sup>, daß Blut in einer Verdünnung auf etwa das 10fache Volumen ein Maximum der Gasabsorption zeige, während sie bei geringerer wie bei stärkerer Verdünnung abnehme. Wenn diese Veränderlichkeit, wie Manchot annimmt, der Affinität zwischen Gasen und Hämoglobin zukäme, so wäre zu erwarten, daß sie auch irgendwie, qualitativ oder quantitativ, in der Farbe des Blutes zum Ausdruck käme; denn die Vereinigung einer gegebenen Menge Hämoglobin mit Sauerstoff oder Kohlenoxyd führt ja bekanntlich zu einer höchst auffallenden Veränderung der Farbe, wobei diese Veränderung bis zu einem bestimmten Maximum mit der Menge des in Reaktion gebrachten Gases zunimmt.

Bei unseren Versuchen haben wir in der Weise gearbeitet, daß die gewählten Verdünnungen möglichst in reziprokem Verhältnis zu den genau bekannten Schichtdicken standen. Da wir jedoch keine besonders geachteten Pipetten und Meßkolben verwandten, auch das ungleichmäßige Festhaften des Blutes an der Wand der Pipetten eine Fehlerquelle darstellt, ist keine

<sup>1)</sup> Untersuchungen über die Sauerstoffbindung im Blute, *Annal. d. Chem.* 370, 241, 1909.

allzu große Genauigkeit zu erwarten. Die Tabelle VII zeigt, daß die Abweichungen in der Stärke der Farbe unbedeutend sind und jedenfalls keinen gesetzmäßigen Gang mit der Verdünnung zeigen. Zur Beurteilung der Qualität einer Farbe dient am besten ein beliebiger — für die betreffende Farbe möglichst charakteristischer — Quotient der Extinktionskoeffizienten (oder Logarithmen von  $\frac{J'}{J}$ ) in verschiedenen Spektralbezirken. Je 3 solcher charakteristischen Quotienten finden sich ebenfalls in Tabelle VII aufgeführt und zeigen, daß auch die Qualität der Farbe überall gleich ist. Bei konstantem Produkt (Schichtdicke  $\times$  Konzentration) haben also Blutlösungen stets die gleiche Farbe, was auch ihre Verdünnung sei.

Tabelle VII.  
Kaninchenblut in Verdünnung mit 0,1%iger Sodalösung  
mit Luft gesättigt.

$\lambda$	Verdünnung 1:218 Schichtdicke 20,594 mm				Verdünnung 1:62 Schichtdicke 5,955 mm		Verdünnung 1:10 Schichtdicke 0,961 mm						
	Ic	IIb	Mittel	Quo- tient	Id	Quo- tient	Ie	IIa	Mittel	Quo- tient			
5099 } 5116 } 5133 }	0,441	0,431	0,436	} 0,348	0,413	} 0,344	0,428	0,422	0,425	} 0,344			
5390 } 5407 } 5424 }	1,263	1,238	1,251		} 1,608		1,200	} 1,623	1,211		1,261	1,236	} 1,632
5578 } 5595 } 5613 }	0,777	0,779	0,778				} 0,599		0,739		} 0,583	0,741	
5749 } 5766 }	1,303	1,295	1,299	} 1,268		} 1,230			} 1,265	1,248		}	

Ein Argument für die Richtigkeit der Ansicht Manchots konnten wir demnach nicht gewinnen.

Einer besonderen Erwähnung bedarf noch der geringfügige Alkaliesenzgrad unserer Lösungen, da Manchot zeigte, daß Alkali das Maximum der Gasabsorption auf geringere Verdünnungsgrade zurückdrängt; jedoch verlegt nach seinen Versuchen 0,3 normale Barytlauge das Maximum erst von der Verdünnung 1:9 auf 1:7, somit dürfte unsere etwa 0,02 normale Sodalösung kaum einen merklichen Einfluß haben. Für die Untersuchung der optischen Eigenschaften des Blutes ist geringer Alkalizusatz bekanntlich notwendig, weil sonst in verdünnten Lösungen ausfallende Globuline die Lichtabsorption verstärken.

An dieser Stelle sei uns erlaubt, auf einen Punkt in Manchots eigenen Versuchen aufmerksam zu machen, der es geradezu auszuschließen scheint, daß eine bedeutende Änderung der Gasbindefähigkeit des Blutfarbstoffs mit wechselnder Konzentration stattfindet. Manchot arbeitete stets mit Blut und fand die Veränderlichkeit mit der „Verdünnung“, gleichgültig, ob er dazu Wasser, isotonische oder hypertonische Lösungen anwandte<sup>1)</sup>. In isotonischen Lösungen wird jedoch die Konzentration der in Reaktion tretenden Hämoglobinmoleküle im Blutkörperchen gar nicht verändert, in hypertonischen durch Entquellung eher gesteigert. So drängt die Erscheinung zu dem Schluß, daß die Aufnahmefähigkeit des Serums für Gase in irgendeiner Weise beteiligt sei. Dazu stimmt, daß Manchot bei Verdünnung mit Serum eine geringere Variationsbreite fand, und daß Letsche<sup>2)</sup> in zwei Versuchen mit serumfreien Hämoglobininlösungen keine Differenz in der Gasbindefähigkeit fand, obwohl die angewandten Konzentrationen (11,5 und 1,5%) denen des natürlichen und des 10fach verdünnten Blutes sehr nahe kamen.

Die wichtige Frage, ob — bei Unterdrückung jeder Dissoziation — das Hämoglobinmolekül nur ein Molekül Gas zu binden vermag oder mehr, wird nach unserer Ansicht in klassischer Weise, zwingend und definitiv, erst dann zu beantworten sein, wenn unsere Kenntnisse über die Löslichkeit von Gasen in Hämoglobininlösungen und über die Adsorbierbarkeit von Gasen an gelösten Kolloiden auf eine festere Grundlage gestellt sein werden.

### C. Farbe verschiedener Blutarten.

Außer dem im vorigen Abschnitt besprochenen, fünfmal fixierten Spektrum eines Kaninchenblutes haben wir noch das Blut zweier weiterer Kaninchen, eine Probe Hammel- und eine Probe Schweineblut untersucht. Ohne diesem Material eine entscheidende Rolle zuzuschreiben, möchten wir es doch in der Weise bearbeiten, daß es für die wichtige und viel umstrittene

<sup>1)</sup> Wie uns aus mündlichen Gesprächen bekannt ist, ist dies schon verschiedenen an der Frage interessierten Forschern aufgefallen.

<sup>2)</sup> Über das Verhalten von Hämoglobin gegen Hydrazin und die Frage nach dem Gasbindungsvermögen des Blutfarbstoffs. Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 189, 1910.

Frage, ob der Blutfarbstoff unter allen Umständen eine einheitliche Substanz sei, mit verwertet werden kann. Dabei führen wir auch die Zahlen für das Schweineblutpektrum mit an, obwohl in dessen Absorptionsstreifen — wegen unerwartet hoher Hämoglobinkonzentration und infolgedessen geringerer Durchlässigkeit — die Werte schwächer Schwärzungen von geringerer Messungsgenauigkeit sind.

Zur Charakterisierung der Farbe des Blutes hat Hufner den Quotienten  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  besonders brauchbar gefunden, d. h. den Quotienten der Extinktionskoeffizienten in den Spektralbezirken 531,5 bis 542,5 und 554 bis 565  $\mu\mu$ ; sie entsprechen etwa dem Helligkeitsminimum des „zweiten“, im Grün gelegenen Streifens des Oxyhämoglobins und dem Helligkeitsmaximum zwischen beiden Streifen. Butterfield<sup>1)</sup> wählte neuerdings die Bezirke etwas schmaler, nämlich 533,5 bis 542,0 und 556,1 bis 564,6  $\mu\mu$ . Ihre Breite ist im wesentlichen durch praktisch-technische Rücksichten bei der optischen Spektrophotometrie bedingt, und ebenso auch ihre genauere Lage. Daher weichen auch die Resultate verschiedener Autoren ein wenig voneinander ab<sup>2)</sup>.

Da uns eine kontinuierliche Reihe von Zahlen für  $\lg\left(\frac{J'}{J}\right)$  über das ganze in Betracht kommende Spektralgebiet hin vorliegt, so ist es leicht, die Werte herauszusuchen, die genau an den Stellen des Helligkeitsminimums und -maximums liegen. Es sind dies die Werte für die Wellenlänge von 540,7 und 559,5.

In Tabelle VIII sind für diese Stellen die Quotienten der Extinktionskoeffizienten angegeben, wie sie sich aus einmaliger Messung ergeben. Außerdem haben wir aber auch jeweils die Quotienten aus den Mittelwerten dreier benachbarter Zahlen — genau wie in dem Beispiel des vorigen Abschnitts — gebildet. Endlich haben wir auch das Mittel aus allen Zahlen, die in der Breite der von Hufner angegebenen Spektralbezirke liegen, zur Bildung des Quotienten  $\frac{\epsilon'}{\epsilon}$  benutzt.

<sup>1)</sup> Über die Lichtextinktion, das Gasbindungsvermögen und den Eisengehalt des menschlichen Blutfarbstoffs in normalen und krankhaften Zuständen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 173, 1911.

<sup>2)</sup> Siehe Butterfield, l. c. S. 199.



Außer diesem Quotienten  $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$  haben wir noch einen weiteren charakteristischen Quotienten angegeben, den wir  $\frac{\varepsilon}{\varepsilon^0}$  nennen wollen, nämlich der Extinktionskoeffizienten im Helligkeitsmaximum zwischen beiden Streifen und im Helligkeitsminimum des ersten, im Gelb liegenden Streifens des Oxyhämoglobins.

Nicht weniger charakteristisch würde ein Quotient  $\frac{\varepsilon''}{\varepsilon'}$  sein, wobei man das Helligkeitsmaximum jenseits des zweiten Streifens mit dem Helligkeitsminimum in diesem in Beziehung setzen würde. Da unsere Messungen nicht soweit reichen, haben wir uns begnügt, unsere drei äußersten Messungen zum Mittel zu vereinigen und mit dem entsprechenden Mittelwert für den zweiten Streifen zu dividieren; diese äußersten Messungen entsprechen der Stelle, wo die Zunahme der Aufhellung an dem dem Violett zugekehrten Rande des zweiten Streifens eine geringe wird. Aus diesem Grunde sei dieser provisorische Quotient als  $\frac{\varepsilon^{v'}}{\varepsilon'}$  bezeichnet.

Tabelle VIII.

Quotient	$\lambda$	I	II	III	IV	V	Mittel	I	II	III	IV	V
		Kaninchen 3	Kaninchen 1	Kaninchen 2 Mittel	Ham-mel Mittel	Schwein		Diff.	Diff.	Diff.	Diff.	Diff.
$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$	$\frac{5407}{5595}$	1,675	1,590	1,608	1,633	1,672	1,636	+ 39	- 46	- 28	- 3	+ 36
$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$	$\frac{5390 - 5424}{5578 - 5613}$	1,628	1,567	1,622	1,606	1,621	1,609	+ 19	- 42	+ 13	- 3	+ 12
$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$	$\frac{5321 - 5424}{5544 - 5647}$	1,471	1,451	1,488	1,475	1,516	1,480	- 9	- 29	+ 8	- 5	+ 36
(Hüfner)												
$\frac{\varepsilon}{\varepsilon^0}$	$\frac{5578 - 5613}{5749 - 5766}$	0,615	0,604	0,598	0,609	0,603	0,606	+ 9	- 2	- 8	+ 3	- 3
$\frac{\varepsilon^{v'}}{\varepsilon'}$	$\frac{5099 - 5133}{5390 - 5424}$	0,359	0,367	0,346	0,373	0,351	0,359	$\pm 0$	+ 8	- 13	+ 14	- 8

Die einzelnen Kolumnen dieser Tabelle sind ohne weiteres verständlich. Die Differenzen der Einzelwerte gegen das Mittel sind in Einheiten der dritten Dezimale gegeben. Drücken

wir die übrigbleibenden Reste in Prozenten der betreffenden Quotienten  $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$  usw. aus, so finden wir:

	I	II	III	IV	V
$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$	+ 2,4	- 2,8	- 1,7	- 0,2	+ 2,2
$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$	+ 1,2	- 2,6	+ 0,7	- 0,2	+ 0,7
$\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$	- 0,6	- 2,0	+ 0,5	- 0,3	+ 2,4
$\frac{\varepsilon}{\varepsilon^0}$	+ 1,5	- 0,3	- 1,3	+ 0,5	- 0,5
$\frac{\varepsilon''}{\varepsilon'}$	$\pm 0,0$	+ 2,2	- 3,6	+ 3,9	- 2,2

Fassen wir diese Abweichungen sämtlich als zufällige Fehler auf und erteilen wir allen Quotienten das gleiche Gewicht, so wird der mittlere zufällige Fehler eines einzelnen Quotienten aus den verwandten fünf Blutarten =  $\pm 1,8\%$ .

Die größten Abweichungen dieser Zahlen sind nirgends größer, als entsprechend der erreichbaren Meßgenauigkeit zu erwarten war. Sie führen also zu dem Schluß, daß die von uns untersuchten Blutarten keinen Unterschied der Farbe aufwiesen, der mit unserer Messungsgenauigkeit nachweisbar wäre. In speziell auf diese Frage gerichteten Untersuchungen wird man natürlich unter Verminderung der Gesamtzahl der Messungen an einzelnen Stellen des Spektrums die höchstmögliche Genauigkeit zu erzielen suchen und dann wahrscheinlich eine noch entschiedenere Antwort finden, als jetzt schon möglich ist.

Tabelle VIII zeigt übrigens recht deutlich die Abhängigkeit des gefundenen Quotienten  $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$  von der Breite der ausgeschnittenen Spektralgebiete; je schmaler dies wird, um so größer wird natürlich der Unterschied der Lichtextinktion im Maximum und Minimum. Schon Butterfield hat ja diesen Punkt ausführlich besprochen und für den Unterschied der von verschiedenen Autoren gefundenen Werte verantwortlich gemacht. Daher ist es auch ohne weiteres verständlich, daß wir in der ersten und zweiten Reihe im Mittel einen größeren Quotienten

gefunden haben als Hüfners Durchschnittswert von 1,58. Dagegen ist es auffallend, daß unser Mittelwert der dritten Reihe wesentlich kleiner als Hüfners Wert ist; dies mag vielleicht mit der verschiedenen Breite des Spaltes ( $1/20$  statt  $1/40$  mm) zusammenhängen, vielleicht aber auch mit der Unvollkommenheit des Auges, das bei der optischen Spektrophotometrie eine Fläche noch gleichmäßig hell sieht, wenn sie auch an den Rändern ein wenig dunkler oder heller ist als in der Mitte.

**D. Lage der Absorptionsmaxima und -minima.**

Die Lage der maximalen Extinktion in den beiden Streifen des Oxyhämoglobins ist schon von vielen Autoren mit möglichster Sorgfalt ermittelt worden, von einigen auch die Lage der minimalen Extinktion zwischen beiden Streifen. Unsere Methode, die uns die allmähliche Helligkeitsänderung im Spektrum in Gestalt einer fast geschlossenen Kurve ergibt, erlaubt auch die Bestimmung dieser Umkehrpunkte der Kurve mit großer Sicherheit; in folgender Tabelle IX sind die betreffenden Punkte in Wellenlängen angegeben.

Tabelle IX.

Spektrum	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	If	IIa	IIb	IIc	IId	Mittel
$\beta$ -Streifen (im Grün) . . .	5401	5405	5397	5410	5401	5399	5410	5399	5401	5395	5402
Zwischenband . . .	5803	5597	5602	5595	5601	5593	5591	5596	5591	5605	5597
$\alpha$ -Streifen (im Gelb) . . .	5766	5777	5770	5772	5776	5763	5771	5764	5768	5765	5769

Bei früheren Autoren finden wir folgende Angaben:

	Cherbuliez <sup>1)</sup>	Formánek <sup>2)</sup>	Lewin, Miethe und Stenger <sup>3)</sup>
$\beta$ -Streifen (im Grün) . . .		542	537
Zwischenband . . . . .		559	
$\alpha$ -Streifen (im Gelb) . . .		577	577

Für den  $\alpha$ -Streifen ist die Übereinstimmung so gut man sie erwarten kann; für den  $\beta$ -Streifen möchten wir den von

<sup>1)</sup> Étude spectrophotométrique du Sang oxycarboné. Thèse méd. de Paris 1890.

<sup>2)</sup> Über die Absorptionsspektren des Blutfarbstoffs. Zeitschr. f. analyt. Chem. 40, 507, 1901.

<sup>3)</sup> Über die durch Photographie nachweisbaren spektralen Eigenschaften der Blutfarbstoffe und anderer Farbstoffe des tierischen Körpers. Arch. f. d. ges. Physiol. 118, 88, 1907.

uns gefundenen Wert, der übrigens gleich dem Mittel der früher angegebenen ist, für den zuverlässigsten halten.

### E. Methämoglobin.

Das Spektrum des Methämoglobins haben wir nur einmal aufgenommen, wobei wir keine besonderen Maßregeln trafen, um die Umwandlung des Farbstoffs bis zu dem überhaupt erreichbaren Maximum zu treiben. Als Quotienten  $\frac{\varepsilon'}{\varepsilon}$  erhielten wir bei Berücksichtigung der Wellenlängen 5390 — 5424 : 5578 — 5613 1,212, bei größerer Breite der Spektralbezirke (5321 — 5424 : 5544 — 5647) 1,174. Für gleiche Breiten gibt v. Zeynek<sup>1)</sup> an: 1,185.

Die Lage der Maxima der Lichtextinktion fanden wir etwa bei  $\lambda = 5425$  und  $5740$ , also ein klein wenig verschoben gegenüber den Oxyhämoglobinstreifen. Der Grad der Extinktion war in dem nach Rot zu gelegenen Streifen geringer als im zweiten, das Verhältnis also umgekehrt wie bei Oxyhämoglobin. Daraus glauben wir mit vielen anderen Autoren schließen zu müssen, daß diese beiden Streifen im Methämoglobinspektrum nicht allein beigemischem Oxyhämoglobin zuzuschreiben sind. Ebenso wenig halten wir aber für nötig, beide Streifen als charakteristisch für Methämoglobin anzusehen, sondern zur Deutung der Tatsachen genügt die Annahme, daß dem reinen Methämoglobin eine stärkere Lichtauslöschung in der Gegend von  $\lambda = 540$  zukomme, während die Gegend bei  $\lambda = 575$  sich nicht als „Streifen“ von der Umgebung abzuheben braucht. Wir schließen uns also für den von uns ausgemessenen Abschnitt des Spektrums von alkalischem Methämoglobin völlig den Ausführungen an, wie sie Dittrich<sup>2)</sup> für das neutrale Methämoglobin gegeben hat.

### Anhang.

1. Tabellen.
2. Graphische Darstellung der  $\lg \left( \frac{J_1'}{J_2} \right)$ : Tafel II und III.
3. Kopie der Platte I: Tafel IV.

<sup>1)</sup> Neue Beobachtungen und Versuche über das Methämoglobin. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1899, 464/465.

<sup>2)</sup> Über methämoglobinbildende Gifte. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 29, 247, 1892.

Platte Ia.

Platte Ib.

$\lambda$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)$
5099	37,1	1,365	2,209	47,9	1,728	0,481	36,8	1,353	2,198	49,5	1,781	0,417
5116			2,221	47,7	1,722	0,499			2,207	49,4	1,778	0,429
5133	38,0	1,405	2,232	47,9	1,728	0,504	37,3	1,375	2,216	49,4	1,778	0,438
5150			2,244	47,4	1,712	0,532			2,224	49,1	1,769	0,455
5167	38,2	1,413	2,256	46,5	1,682	0,574	37,6	1,388	2,232	48,7	1,736	0,496
5184			2,267	46,3	1,676	0,591			2,241	48,3	1,744	0,497
5201	38,8	1,437	2,278	45,3	1,644	0,634	38,0	1,405	2,249	47,4	1,714	0,535
5218			2,288	43,5	1,588	0,700			2,258	46,0	1,667	0,591
5235	39,3	1,455	2,298	42,0	1,543	0,755	38,5	1,424	2,266	44,7	1,624	0,642
5253			2,307	40,3	1,490	0,817			2,274	43,4	1,586	0,688
5270	39,5	1,463	2,314	38,4	1,421	0,893	38,7	1,433	2,282	40,8	1,505	0,777
5287			2,320	36,0	1,316	1,004			2,289	39,1	1,448	0,841
5304	40,1	1,483	2,326	34,3	1,238	1,088	39,3	1,455	2,295	37,7	1,392	0,903
5321			2,329	33,2	1,172	1,156			2,300	35,9	1,311	0,989
5338	40,7	1,502	2,332	32,0	1,091	1,241	39,4	1,460	2,303	34,8	1,261	1,042
5356			2,334	31,6	1,058	1,276			2,306	33,8	1,207	1,099
5373	40,2	1,487	2,335	31,2	1,021	1,314	39,6	1,466	2,308	33,1	1,166	1,142
5390			2,334	30,7	0,970	1,364			2,308	32,7	1,141	1,167
5407	40,2	1,487	2,332	30,4	0,933	1,399	39,4	1,460	2,302	32,5	1,128	1,174
5424			2,327	30,6	0,957	1,370			2,293	32,6	1,135	1,158
5442	39,9	1,477	2,320	30,7	0,970	1,350	38,7	1,433	2,283	32,8	1,147	1,136
5459			2,308	31,3	1,032	1,276			2,273	33,0	1,160	1,113
5476	39,2	1,452	2,296	31,7	1,068	1,228	38,4	1,420	2,264	34,0	1,217	1,047
5493			2,284	32,8	1,147	1,137			2,255	35,1	1,273	0,982
5510	38,6	1,429	2,275	34,2	1,228	1,047	38,0	1,405	2,248	36,4	1,335	0,913
5527			2,271	35,7	1,302	0,969			2,243	38,0	1,405	0,838
5544	38,5	1,425	2,268	36,4	1,335	0,933	37,7	1,392	2,239	38,7	1,433	0,806
5561			2,267	37,5	1,383	0,884			2,238	39,7	1,470	0,768
5578	38,4	1,421	2,266	38,2	1,413	0,853	37,8	1,396	2,240	40,5	1,496	0,744
5595			2,268	38,7	1,433	0,835			2,242	40,7	1,503	0,739
5613	38,5	1,425	2,271	38,3	1,417	0,854	37,9	1,400	2,245	40,5	1,496	0,749
5630			2,277	37,4	1,379	0,898			2,248	40,5	1,496	0,752
5647	38,9	1,440	2,284	36,1	1,348	0,936	38,1	1,409	2,252	39,4	1,460	0,792
5664			2,290	35,7	1,302	0,988			2,257	37,9	1,400	0,857
5681	39,2	1,452	2,296	33,8	1,207	1,089	38,1	1,409	2,263	37,1	1,365	0,898
5698			2,305	32,5	1,127	1,178			2,269	34,8	1,259	1,010
5715	39,7	1,470	2,314	31,2	1,021	1,293	38,7	1,433	2,277	33,4	1,184	1,093
5732			2,320	30,6	0,958	1,362			2,283	32,5	1,128	1,155
5749	40,0	1,480	2,323	30,0	0,875	1,448	39,0	1,444	2,286	31,6	1,058	1,228
5766			2,322	30,3	0,920	1,402			2,286	31,5	1,051	1,235
5784	39,8	1,473	2,318	31,2	1,021	1,297	38,8	1,437	2,282	32,1	1,098	1,184
5801			2,312	32,0	1,090	1,222			2,273	33,0	1,159	1,114
5818	39,5	1,463	2,304	34,1	1,222	1,082	38,2	1,413	2,264	35,9	1,311	0,953
5835			2,296	37,0	1,361	0,935			2,255	39,3	1,456	0,799
5852	38,9	1,440	2,284	41,6	1,530	0,754	38,0	1,405	2,248	43,8	1,598	0,650
5870			2,273	46,1	1,669	0,604			2,237	47,1	1,704	0,533
5887	38,2	1,413	2,260	50,6	1,813	0,447	37,4	1,379	2,224	50,7	1,816	0,408
5904			2,246	53,3	1,895	0,351			2,210	53,4	1,898	0,312
5921	37,7	1,392	2,229	54,5	1,934	0,295	36,9	1,357	2,195	54,9	1,948	0,247
5938			2,212	56,0	1,988	0,224			2,179	55,9	1,984	0,195
5956	36,7	1,348	2,195	56,4	2,003	0,192	36,0	1,316	2,163	56,7	2,016	0,147
5973			2,175	56,8	2,020	0,155			2,146	56,4	2,003	0,143
5990	35,8	1,306	2,156	57,2	2,041	0,115	35,4	1,288	2,129	57,2	2,041	0,088
5607	35,7	1,302	2,135	56,6	2,011	0,124	35,0	1,269	2,110	56,7	2,016	0,094

25\*

## Platte Ic.

## Platte Id.

$\lambda$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)^*$
5099	36,5	1,339	2,183	48,4	1,745	0,438	36,0	1,316	2,164	48,5	1,748	0,399
5116			2,187	48,6	1,751	0,436			2,173	48,2	1,738	0,418
5133	36,7	1,348	2,193	48,4	1,745	0,448	36,5	1,339	2,181	48,3	1,741	0,423
5150			2,200	48,1	1,735	0,465			2,189	47,8	1,725	0,447
5167	37,1	1,366	2,210	48,0	1,732	0,478	36,8	1,352	2,197	47,5	1,716	0,464
5184			2,221	46,8	1,692	0,529			2,205	46,7	1,688	0,500
5201	38,0	1,405	2,233	46,1	1,679	0,554	37,2	1,371	2,214	45,7	1,656	0,541
5218			2,249	44,5	1,618	0,631			2,223	44,0	1,603	0,603
5235	38,3	1,417	2,261	43,7	1,595	0,666	37,6	1,388	2,232	42,7	1,564	0,651
5253			2,274	41,4	1,524	0,750			2,244	40,8	1,505	0,722
5270	38,0	1,441	2,285	40,0	1,480	0,805	38,3	1,417	2,257	39,4	1,460	0,780
5287			2,294	37,9	1,400	0,894			2,266	37,9	1,400	0,849
5304	39,4	1,460	2,302	36,1	1,321	0,981	38,6	1,428	2,272	35,8	1,306	0,949
5321			2,307	34,4	1,239	1,068			2,276	34,6	1,248	1,011
5338	39,6	1,466	2,311	33,7	1,201	1,110	38,8	1,436	2,279	33,4	1,184	1,078
5356			2,314	32,9	1,154	1,160			2,280	32,6	1,134	1,129
5373	39,7	1,470	2,313	32,2	1,106	1,207	38,8	1,436	2,280	32,1	1,099	1,164
5390			2,308	31,5	1,049	1,259			2,279	31,6	1,058	1,204
5407	39,3	1,456	2,300	31,5	1,049	1,251	38,7	1,433	2,275	31,7	1,067	1,191
5424			2,291	31,1	1,012	1,279			2,270	31,5	1,049	1,204
5442	38,8	1,437	2,283	31,7	1,067	1,216	38,3	1,417	2,262	31,6	1,058	1,187
5459			2,275	32,1	1,098	1,177			2,253	31,9	1,082	1,154
5476	38,5	1,424	2,267	33,1	1,166	1,091	37,9	1,400	2,244	33,3	1,178	1,049
5493			2,260	34,5	1,244	1,016			2,231	33,9	1,212	1,002
5510	38,1	1,409	2,254	35,6	1,297	0,957	37,3	1,375	2,221	35,7	1,302	0,902
5527			2,248	37,0	1,361	0,887			2,215	37,3	1,375	0,823
5544	37,9	1,400	2,242	37,8	1,396	0,846	37,1	1,366	2,212	37,9	1,400	0,795
5561			2,236	38,9	1,440	0,796			2,211	38,5	1,425	0,769
5578	37,4	1,379	2,233	39,2	1,452	0,781	37,2	1,370	2,211	39,3	1,456	0,738
5595			2,232	39,2	1,452	0,780			2,213	39,5	1,463	0,733
5613	37,7	1,392	2,236	39,7	1,466	0,770	37,2	1,370	2,218	39,3	1,456	0,745
5630			2,240	38,8	1,436	0,804			2,220	38,9	1,440	0,763
5647	37,9	1,400	2,245	38,1	1,409	0,836	37,5	1,384	2,228	37,8	1,396	0,815
5664			2,252	36,6	1,343	0,909			2,236	36,6	1,343	0,876
5681	38,1	1,409	2,259	35,2	1,278	0,981	37,9	1,400	2,245	34,9	1,264	0,964
5698			2,266	33,3	1,178	1,088			2,254	33,3	1,178	1,059
5715	38,7	1,433	2,274	32,2	1,106	1,168	38,4	1,421	2,263	32,4	1,121	1,125
5732			2,281	30,8	0,979	1,302			2,269	31,2	1,021	1,231
5749	38,9	1,441	2,283	30,8	0,979	1,304	38,6	1,429	2,271	30,9	0,991	1,263
5766			2,281	30,8	0,979	1,302			2,269	30,8	0,979	1,273
5784	38,7	1,433	2,276	31,3	1,031	1,245	38,2	1,413	2,262	31,6	1,058	1,187
5801			2,269	32,7	1,140	1,129			2,249	32,8	1,147	1,085
5818	38,2	1,413	2,261	34,7	1,254	1,007	37,8	1,396	2,234	35,3	1,283	0,934
5835			2,252	38,6	1,429	0,823			2,220	38,8	1,436	0,767
5852	38,1	1,411	2,241	42,3	1,552	0,689	37,7	1,392	2,206	42,7	1,564	0,625
5870			2,230	47,5	1,716	0,514			2,193	47,9	1,728	0,448
5887	37,3	1,375	2,218	50,6	1,813	0,405	36,5	1,339	2,181	50,8	1,819	0,345
5904			2,204	53,4	1,898	0,306			2,167	53,3	1,895	0,255
5921	36,7	1,348	2,192	54,8	1,945	0,247	35,8	1,307	2,155	54,6	1,938	0,200
5938			2,178	55,3	1,962	0,216			2,142	55,6	1,972	0,163
5956	36,1	1,321	2,165	56,4	2,003	0,162	35,5	1,292	2,129	55,9	1,984	0,128
5973			2,152	56,5	2,008	0,144			2,116	56,1	1,991	0,108
5990	36,4	1,335	2,137	56,3	1,999	0,138	34,8	1,258	2,102	56,5	2,008	0,077
6007			2,122	56,1	1,991	0,131	34,5	1,244	2,088	56,5	2,008	0,063

\*  $\lg J_2'$  ist gleich  $\lg J_2 + 0,017$  (Korr. wegen Reflexion des Glasblockes).

Platte Ie.

Platte If.

$\lambda$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)^{*)}$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)^{*)}$
5099	37,1	1,365	2,209	49,7	1,787	0,406	38,1	1,409	2,253	49,2	1,772	0,481
5116			2,219	49,1	1,769	0,434			2,257	49,1	1,768	0,489
5133	37,5	1,384	2,228	49,1	1,769	0,443	38,3	1,417	2,261	49,3	1,775	0,486
5150			2,236	48,8	1,758	0,462			2,266	48,7	1,756	0,510
5167	37,9	1,400	2,244	48,4	1,745	0,483	38,6	1,428	2,272	48,3	1,744	0,528
5184			2,251	48,0	1,732	0,503			2,278	47,9	1,728	0,550
5201	38,2	1,413	2,258	47,7	1,722	0,520	38,9	1,440	2,287	47,0	1,699	0,588
5218			2,265	46,0	1,666	0,583			2,297	45,5	1,650	0,647
5235	38,6	1,429	2,274	45,2	1,640	0,618	39,5	1,463	2,307	44,4	1,615	0,692
5253			2,287	43,1	1,577	0,694			2,316	42,4	1,555	0,761
5270	39,3	1,455	2,299	41,3	1,521	0,762	40,0	1,480	2,326	40,6	1,499	0,827
5287			2,308	38,8	1,436	0,856			2,335	38,0	1,405	0,930
5304	39,8	1,473	2,314	37,3	1,375	0,923	40,6	1,499	2,344	36,6	1,343	1,001
5321			2,318	35,8	1,306	0,996			2,352	34,7	1,254	1,098
5338	39,9	1,476	2,319	34,5	1,244	1,059	41,1	1,515	2,358	33,8	1,206	1,152
5356			2,320	33,5	1,190	1,114			2,359	32,7	1,140	1,219
5373	39,9	1,476	2,319	32,9	1,154	1,149	40,7	1,502	2,356	32,3	1,114	1,242
5390			2,318	32,1	1,098	1,204			2,351	32,0	1,090	1,261
5407	39,8	1,473	2,315	32,1	1,098	1,201	40,3	1,490	2,345	31,9	1,082	1,263
5424			2,312	31,7	1,067	1,229			2,337	32,0	1,090	1,247
5442	39,5	1,463	2,306	32,2	1,106	1,184	40,2	1,486	2,326	31,9	1,082	1,244
5459			2,297	33,1	1,166	1,115			2,316	33,1	1,166	1,150
5476	38,9	1,441	2,284	33,9	1,212	1,056	39,7	1,470	2,306	34,1	1,222	1,084
5493			2,270	35,1	1,273	0,981			2,296	35,4	1,288	1,008
5510	38,2	1,413	2,260	36,2	1,325	0,919	38,9	1,440	2,288	36,4	1,335	0,953
5527			2,254	37,6	1,388	0,850			2,283	38,2	1,413	0,870
5544	38,0	1,405	2,250	38,8	1,436	0,798	38,8	1,436	2,280	39,1	1,448	0,832
5561			2,250	39,9	1,476	0,758			2,278	40,1	1,483	0,795
5578	38,1	1,409	2,251	40,4	1,493	0,742	38,8	1,436	2,278	40,5	1,496	0,782
5595			2,254	40,5	1,496	0,742			2,280	40,6	1,499	0,781
5613	38,2	1,413	2,257	40,7	1,502	0,739	38,7	1,433	2,283	40,5	1,496	0,787
5630			2,261	40,4	1,493	0,752			2,287	39,4	1,460	0,827
5647	38,3	1,417	2,268	39,4	1,460	0,792	39,3	1,456	2,292	38,8	1,436	0,856
5664			2,276	38,2	1,413	0,847			2,298	37,3	1,375	0,923
5681	39,0	1,444	2,288	36,4	1,335	0,937	39,4	1,460	2,305	35,6	1,297	1,008
5698			2,296	34,8	1,258	1,022			2,313	33,8	1,206	1,107
5715	39,4	1,460	2,303	33,5	1,189	1,098	40,0	1,480	2,324	32,3	1,114	1,210
5732			2,306	32,3	1,114	1,176			2,332	31,6	1,058	1,274
5749	39,5	1,463	2,308	31,6	1,059	1,233	40,5	1,496	2,336	31,0	1,000	1,336
5766			2,308	31,7	1,066	1,226			2,336	31,3	1,031	1,305
5784	39,5	1,463	2,305	32,1	1,098	1,191	40,2	1,486	2,332	31,8	1,075	1,257
5801			2,298	33,1	1,166	1,116			2,326	33,9	1,212	1,114
5818	38,9	1,440	2,285	36,1	1,321	0,948	39,6	1,466	2,319	36,4	1,335	0,984
5835			2,274	39,4	1,460	0,798			2,312	40,5	1,496	0,816
5852	38,3	1,417	2,265	44,5	1,618	0,631	39,4	1,460	2,303	44,4	1,615	0,688
5870			2,258	48,1	1,737	0,505			2,292	48,9	1,763	0,529
5887	38,1	1,409	2,248	51,4	1,837	0,395	38,8	1,436	2,278	51,9	1,852	0,426
5904			2,236	53,9	1,914	0,306			2,261	54,8	1,944	0,317
5921	37,4	1,379	2,219	55,1	1,955	0,248	37,8	1,396	2,243	55,7	1,976	0,267
5938			2,201	56,4	2,003	0,182			2,224	56,4	2,003	0,221
5956	36,5	1,339	2,182	56,5	2,007	0,159	37,1	1,366	2,206	56,4	2,003	0,203
5973			2,161	57,1	2,036	0,109			2,185	56,7	2,016	0,169
5990	35,5	1,292	2,141	56,7	2,016	0,109	36,2	1,325	2,166	56,5	2,007	0,159
6007	35,4	1,287	2,120	57,0	2,030	0,074	35,8	1,306	2,150	56,7	2,016	0,134

\*)  $\lg J_2'$  ist gleich  $\lg J_2 + 0,016$  (Korr. wegen Reflexion des Glasblockes).

## Platte IIa.

## Platte IIb.

$i$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)^*)$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)$
5099	36,7	1,375	2,249	49,0	1,823	0,410	36,7	2,375	2,245	49,4	1,839	0,406
5116			2,257	48,8	1,816	0,425			2,255	49,1	1,826	0,429
5133	37,3	1,403	2,265	48,9	1,819	0,430	37,3	1,408	2,264	48,6	1,807	0,457
5150			2,274	48,7	1,812	0,446			2,274	48,7	1,812	0,462
5167	37,5	1,412	2,283	48,2	1,792	0,475	37,3	1,403	2,283	48,4	1,800	0,483
5184			2,294	47,3	1,763	0,515			2,292	47,7	1,775	0,517
5201	38,0	1,434	2,304	46,7	1,743	0,545	38,0	1,434	2,302	46,6	1,739	0,563
5218			2,316	45,7	1,707	0,593			2,311	45,8	1,710	0,601
5235	38,7	1,463	2,327	44,3	1,659	0,652	38,3	1,446	2,320	43,5	1,633	0,687
5253			2,338	42,5	1,601	0,721			2,329	42,5	1,601	0,728
5270	38,9	1,470	2,349	40,5	1,531	0,802	39,3	1,486	2,339	40,1	1,516	0,823
5287			2,359	38,4	1,451	0,892			2,348	38,2	1,442	0,906
5304	39,6	1,498	2,368	37,1	1,394	0,958	39,2	1,482	2,354	36,6	1,370	0,984
5321			2,374	35,2	1,300	1,058			2,359	35,2	1,300	1,059
5338	39,8	1,505	2,376	34,2	1,246	1,114	39,5	1,494	2,360	33,9	1,229	1,131
5356			2,376	33,1	1,178	1,182			2,359	33,1	1,178	1,181
5373	39,8	1,505	2,374	32,2	1,114	1,244	39,1	1,478	2,354	32,7	1,151	1,203
5390			2,370	32,0	1,099	1,255			2,348	32,1	1,106	1,242
5407	39,4	1,490	2,365	31,9	1,090	1,259	38,9	1,470	2,339	32,1	1,106	1,233
5424			2,358	31,7	1,074	1,268			2,328	31,9	1,090	1,238
5442	39,1	1,478	2,348	32,0	1,099	1,233	38,8	1,467	2,318	32,5	1,138	1,180
5459			2,334	32,3	1,122	1,196			2,309	32,5	1,138	1,171
5476	38,3	1,446	2,321	33,2	1,185	1,120	38,6	1,459	2,302	33,9	1,229	1,073
5493			2,311	34,6	1,268	1,027			2,297	34,7	1,274	1,023
5510	38,0	1,434	2,305	35,6	1,321	0,968	37,5	1,412	2,293	36,1	1,346	0,947
5527			2,299	37,4	1,407	0,876			2,290	37,3	1,406	0,884
5544	37,9	1,429	2,295	38,3	1,446	0,833	37,5	1,412	2,288	38,3	1,446	0,842
5561			2,292	39,8	1,504	0,772			2,288	38,8	1,467	0,821
5578	37,6	1,416	2,290	39,8	1,504	0,770	37,7	1,420	2,292	40,3	1,523	0,769
5595			2,292	39,7	1,501	0,775			2,296	39,9	1,508	0,788
5613	37,8	1,425	2,298	40,0	1,512	0,770	38,0	1,434	2,300	40,2	1,520	0,780
5630			2,308	39,4	1,490	0,802			2,305	39,4	1,490	0,815
5647	38,3	1,446	2,316	38,7	1,463	0,837	38,0	1,434	2,309	38,8	1,467	0,842
5664			2,324	37,1	1,394	0,914			2,315	36,8	1,380	0,935
5681	38,6	1,459	2,330	35,6	1,321	0,993	38,4	1,451	2,320	35,7	1,326	0,994
5698			2,335	34,2	1,246	1,073			2,326	34,0	1,235	1,091
5715	38,8	1,467	2,338	32,8	1,158	1,164	38,6	1,459	2,332	32,6	1,145	1,187
5732			2,340	31,9	1,090	1,234			2,337	31,8	1,081	1,256
5749	38,9	1,470	2,341	31,7	1,074	1,251	39,0	1,474	2,338	31,5	1,056	1,282
5766			2,340	31,4	1,046	1,278			2,336	31,2	1,028	1,308
5784	38,8	1,467	2,339	32,0	1,099	1,224	38,6	1,459	2,329	32,2	1,114	1,215
5801			2,336	33,2	1,185	1,135			2,319	33,9	1,229	1,090
5818	38,8	1,467	2,330	35,9	1,336	0,978	38,1	1,438	2,309	35,8	1,331	0,978
5835			2,322	40,9	1,545	0,761			2,296	40,2	1,520	0,776
5852	37,8	1,425	2,309	43,6	1,637	0,656	37,5	1,412	2,283	43,6	1,637	0,646
5870			2,293	47,3	1,762	0,515			2,270	48,8	1,816	0,454
5887	37,8	1,425	2,274	50,4	1,876	0,382	37,7	1,421	2,257	50,3	1,873	0,384
5904			2,254	53,0	1,966	0,272			2,244	53,1	1,969	0,275
5921	36,3	1,356	2,233	54,1	2,003	0,214	36,3	1,356	2,232	53,9	1,997	0,235
5938			2,213	55,3	2,057	0,140			2,218	54,8	2,031	0,189
5956	36,1	1,347	2,195	55,4	2,063	0,116	35,9	1,336	2,204	56,6	2,180	0,024
5973			2,180	55,8	2,089	0,075			2,189	55,2	2,052	0,137
5990	35,1	1,295	2,168	55,7	2,081	0,071	35,0	1,291	2,172	55,4	2,063	0,109
6007	34,8	1,278	2,149	55,8	2,089	0,044	35,0	1,291	2,157	55,6	2,075	0,082

\*)  $\lg J_2'$  ist gleich  $\lg J_2 + 0,016$  (Korr. wegen Reflexion des Glasblockes).



Platte IIc

Platte IId

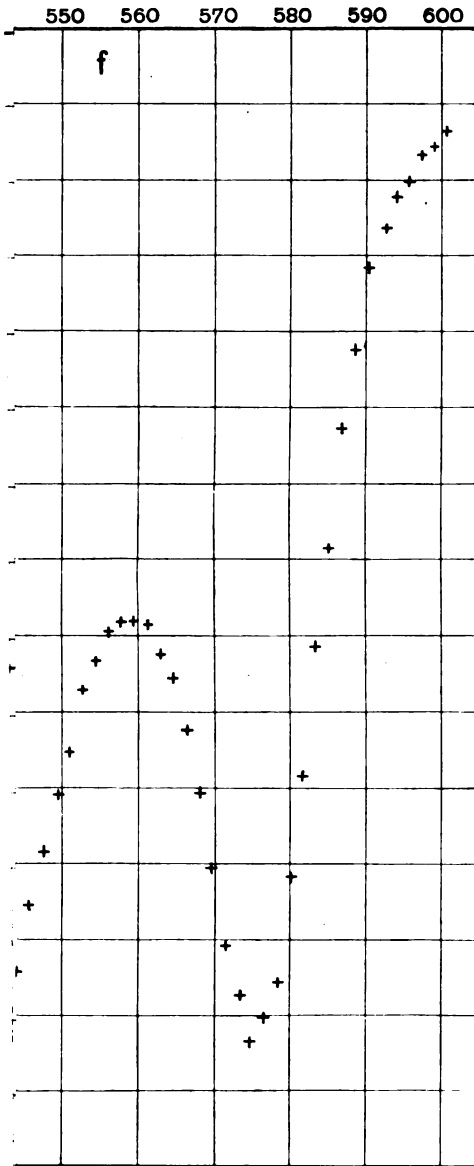
$\lambda$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)$
5099	37,5	1,412	2,283	49,4	1,839	0,444	37,2	1,398	2,259	45,2	1,690	0,569
5116			2,293	49,3	1,834	0,459			2,266	45,1	1,686	0,580
5133	38,0	1,434	2,304	49,3	1,834	0,470	37,1	1,394	2,275	44,6	1,669	0,606
5150			2,313	49,3	1,834	0,479			2,284	44,0	1,650	0,634
5167	38,4	1,451	2,324	48,7	1,812	0,512	37,8	1,425	2,294	43,6	1,637	0,657
5184			2,334	48,3	1,796	0,538			2,304	42,7	1,608	0,696
5201	38,9	1,470	2,343	47,2	1,759	0,584	38,1	1,438	2,316	41,5	1,568	0,738
5218			2,353	45,9	1,714	0,639			2,328	40,2	1,520	0,808
5235	39,6	1,498	2,362	44,6	1,670	0,692	38,9	1,470	2,339	38,1	1,438	0,901
5253			2,372	42,2	1,591	0,781			2,349	35,9	1,336	1,013
5270	39,8	1,504	2,379	40,4	1,527	0,852	39,2	1,482	2,359	34,6	1,268	1,091
5287			2,385	38,9	1,470	0,915			2,370	32,5	1,138	1,232
5304	40,5	1,530	2,389	37,1	1,394	0,995	40,0	1,512	2,380	31,5	1,057	1,323
5321			2,392	35,7	1,326	1,066			2,385	30,7	0,972	1,413
5338	40,3	1,524	2,394	34,5	1,262	1,132	40,2	1,520	2,386	30,2	0,889	1,497
5356			2,394	33,5	1,204	1,190			2,382	29,5	0,711	1,671
5373	40,3	1,524	2,391	33,0	1,172	1,219	39,7	1,500	2,377	29,6	0,739	1,638
5390			2,388	32,5	1,137	1,251			2,371	29,5	0,711	1,660
5407	39,9	1,508	2,383	31,9	1,090	1,293	39,6	1,498	2,363	29,4	0,668	1,695
5424			2,378	32,1	1,106	1,272			2,355	29,5	0,711	1,644
5442	39,7	1,500	2,371	32,5	1,137	1,234	38,9	1,470	2,345	29,6	0,739	1,606
5459			2,364	33,2	1,185	1,179			2,334	29,8	0,799	1,635
5476	39,3	1,486	2,357	34,1	1,242	1,115	38,8	1,467	2,322	29,9	0,822	1,500
5493			2,350	35,8	1,331	1,019			2,313	30,7	0,972	1,341
5510	38,9	1,470	2,342	36,6	1,370	0,972	37,9	1,430	2,306	31,1	1,018	1,288
5527			2,334	37,8	1,425	0,909			2,300	32,6	1,144	1,156
5544	38,6	1,458	2,328	39,2	1,482	0,846	38,0	1,434	2,297	33,0	1,171	1,126
5561			2,322	39,7	1,501	0,821			2,294	33,8	1,224	1,070
5578	38,3	1,446	2,319	40,3	1,523	0,796	37,7	1,420	2,292	34,3	1,252	1,040
5595			2,317	40,4	1,527	0,790			2,292	34,8	1,279	1,013
5613	38,3	1,446	2,318	40,4	1,527	0,791	37,9	1,429	2,293	34,5	1,262	1,031
5630			2,323	39,3	1,486	0,837			2,296	33,8	1,224	1,072
5647	38,6	1,458	2,328	38,6	1,458	0,870	38,0	1,434	2,302	34,1	1,241	1,061
5664			2,335	37,2	1,398	0,937			2,311	32,3	1,122	1,189
5681	38,7	1,463	2,344	35,8	1,331	1,013	38,0	1,434	2,321	31,1	1,018	1,303
5698			2,352	34,0	1,233	1,119			2,328	30,6	0,944	1,384
5715	39,4	1,490	2,358	32,4	1,129	1,229	38,7	1,462	2,333	30,0	0,846	1,487
5732			2,360	31,8	1,081	1,279			2,334	29,6	0,739	1,595
5749	39,4	1,490	2,361	31,5	1,057	1,304	38,8	1,467	2,334	29,2	0,590	1,744
5766			2,360	31,9	1,089	1,271			2,333	29,4	0,668	1,665
5784	39,3	1,486	2,358	31,8	1,081	1,277	38,5	1,456	2,330	29,7	0,771	1,559
5801			2,354	34,2	1,246	1,108			2,326	30,8	0,985	1,341
5818	39,2	1,482	2,348	36,3	1,357	0,991	38,3	1,446	2,321	32,3	1,122	1,199
5835			2,342	40,1	1,516	0,826			2,314	34,5	1,262	1,052
5852	38,7	1,462	2,334	44,8	1,676	0,658	38,0	1,434	2,306	38,7	1,463	0,843
5870			2,323	48,4	1,800	0,523			2,296	43,1	1,621	0,675
5887	38,1	1,438	2,309	51,6	1,919	0,390	37,7	1,420	2,281	47,6	1,772	0,509
5904			2,290	53,1	1,969	0,331			2,263	50,3	1,873	0,390
5921	37,7	1,421	2,269	54,7	2,027	0,242	36,7	1,375	2,245	52,8	1,960	0,285
5938			2,251	55,2	2,052	0,199			2,228	54,0	2,000	0,228
5956	36,4	1,361	2,234	55,8	2,089	0,145	35,9	1,336	2,210	54,0	2,000	0,210
5973			2,219	56,4	2,153	0,066			2,192	55,1	2,046	0,146
5990	35,9	1,336	2,205	56,3	2,141	0,064	35,3	1,306	2,174	54,9	2,037	0,137
6007	35,4	1,312	2,185	56,1	2,118	0,067	34,6	1,268	2,144	55,3	2,057	0,087

## Platte IIe

## Platte IIe

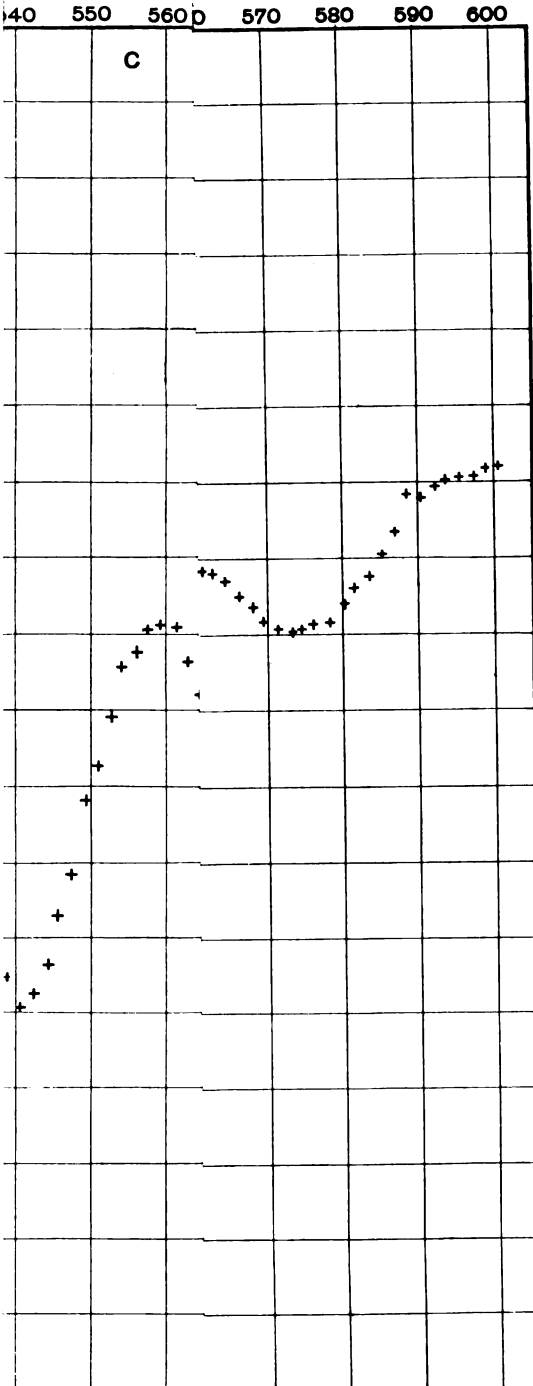
$\lambda$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)$	$\lambda$	$S_1$	$\lg J_1$	$\lg J_1'$	$S_2$	$\lg J_2$	$\lg \left(\frac{J_1'}{J_2}\right)$	
5099	37,7	1,420	2,292	44,6	1,668	0,624	5561				2,332	42,5	1,600	0,732
5116			2,299	45,0	1,681	0,618	5578	38,6	1,459	2,331	42,8	1,610	0,721	
5133	38,1	1,438	2,307	45,1	1,684	0,623	5595				2,332	43,2	1,623	0,709
5150			2,315	45,2	1,687	0,628	5613	38,7	1,463	2,336	43,1	1,620	0,716	
5167	38,4	1,451	2,324	45,4	1,696	0,628	5630				2,343	43,3	1,626	0,717
5184			2,334	45,3	1,693	0,641	5647	39,3	1,486	2,357	43,4	1,630	0,727	
5201	39,5	1,494	2,346	45,5	1,700	0,646	5664				2,367	43,0	1,617	0,750
5218			2,356	44,8	1,676	0,680	5681	39,9	1,508	2,375	42,8	1,610	0,765	
5235	39,6	1,498	2,368	44,6	1,668	0,700	5698				2,381	42,5	1,600	0,781
5253			2,380	44,3	1,658	0,722	5715	40,0	1,512	2,385	42,3	1,593	0,792	
5270	40,2	1,520	2,390	44,0	1,649	0,741	5732				2,386	42,2	1,590	0,796
5287			2,397	43,5	1,633	0,764	5749	40,1	1,516	2,383	42,2	1,590	0,793	
5304	40,4	1,527	2,403	42,8	1,609	0,794	5766				2,379	42,2	1,590	0,789
5321			2,408	42,5	1,600	0,808	5784	39,6	1,498	2,372	42,2	1,590	0,782	
5338	40,8	1,541	2,413	42,2	1,589	0,824	5801				2,364	42,6	1,604	0,760
5356			2,416	41,8	1,573	0,843	5818	39,3	1,486	2,355	43,0	1,617	0,738	
5373	41,2	1,556	2,417	41,5	1,566	0,851	5835				2,346	43,2	1,623	0,723
5390			2,414	41,0	1,549	0,855	5852	38,7	1,463	2,336	43,8	1,642	0,694	
5407	40,6	1,534	2,407	40,7	1,538	0,869	5870				2,325	44,4	1,662	0,663
5424			2,397	40,5	1,530	0,867	5887	38,2	1,442	2,313	45,5	1,700	0,613	
5442	40,2	1,520	2,387	40,3	1,523	0,864	5904				2,302	45,0	1,682	0,620
5459			2,376	40,7	1,538	0,838	5921	37,5	1,412	2,291	45,1	1,686	0,605	
5476	39,5	1,494	2,365	41,0	1,549	0,816	5938				2,279	44,9	1,680	0,598
5493			2,354	41,4	1,562	0,792	5956	36,6	1,371	2,267	44,7	1,673	0,594	
5510	39,0	1,475	2,346	41,9	1,579	0,767	5973				2,254	44,3	1,658	0,596
5527			2,340	42,2	1,590	0,750	5990	35,9	1,336	2,242	44,2	1,656	0,586	
5544	38,7	1,463	2,335	42,8	1,609	0,726	6007	35,4	1,311	2,230	44,0	1,650	0,580	

Tafel II.

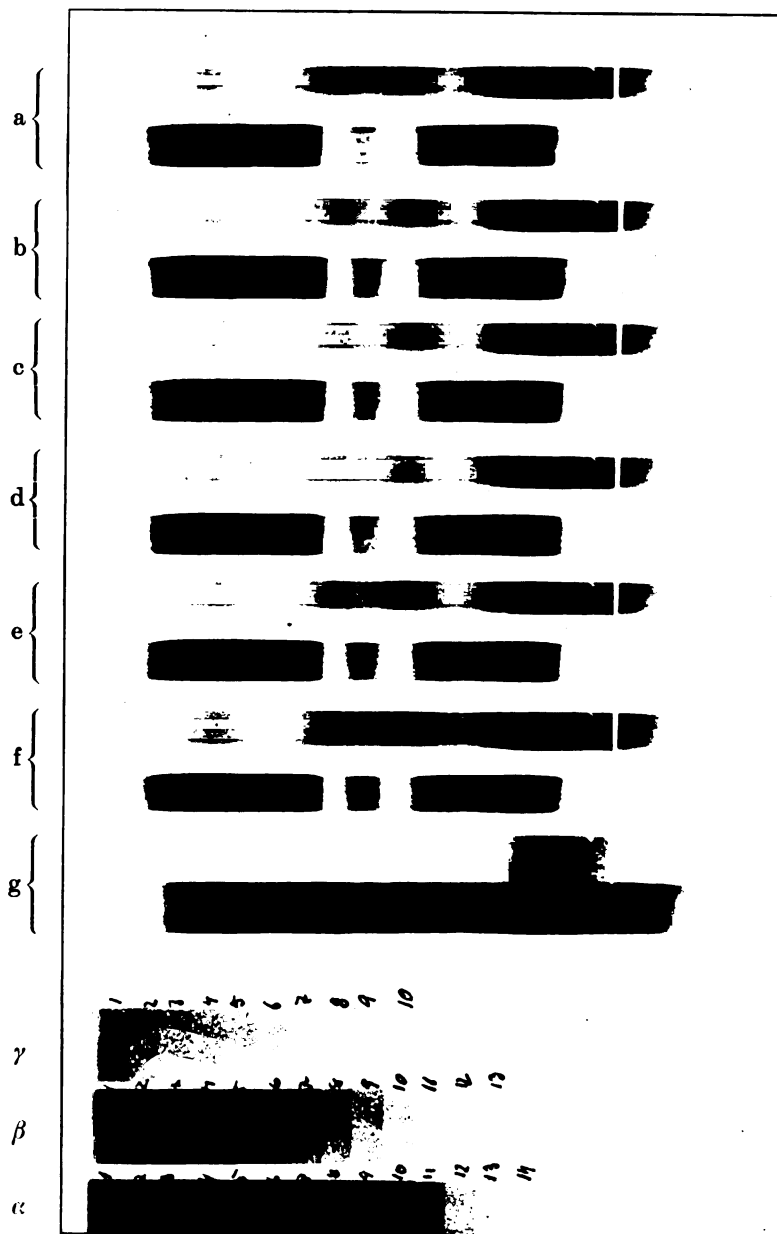




Tafel III.











## Beitrag zur Lehre von der Uraminosäurebildung.

Von

Walter Weiland<sup>1)</sup>.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1911.)

Gelegentlich einer im Jahre 1904 begonnenen Arbeit über Milchsäurebildung in der künstlich durchbluteten Leber stellten Embden und Almagia auch einen Versuch mit Zusatz einer größeren Menge l-Leucin zum Durchblutungsblut an. Sie machten dabei die Beobachtung, daß sich während der Ätherextraktion des enteweißten, eingeengten und angesäuerten Durchblutungsblutes im Kutscher-Steudelschen Apparate in geringer Menge eine krystallisierte Substanz aus dem Extraktionsäther ausschied. Die nach Abtrennung des Äthers gewonnene Substanz war in kaltem Wasser schwer löslich und konnte aus heißem Wasser leicht umkrystallisiert werden. Angaben über den Schmelzpunkt sind nicht mehr erhalten. Die Substanz

---

<sup>1)</sup> Die dieser Arbeit zugrunde liegenden experimentellen Untersuchungen wurden im Jahre 1908 abgeschlossen. Sie sind unterdessen zu einem wesentlichen Teil durch eine im Jahre 1910 veröffentlichte Arbeit Dakins überholt. (H. D. Dakin: The fate of inactive tyrosine in the animal body together with some observations upon the detection of tyrosine and its derivatives in the urine. The synthesis and probable mode of formation of Blendermanns Parahydroxybenzylhydantoin. The Journal of biological Chemistry 8, 25 ff., 1910 and 1911.)

Wenn trotzdem meine Befunde noch heute veröffentlicht werden, so kommt ihnen also teilweise nur der Wert einer Bestätigung der eben angeführten Arbeit Dakins zu.

Immerhin finden sich in der vorliegenden Arbeit einige — praktisch vielleicht nicht unwichtige — neue Angaben über Isolierung von gewissen Uraminosäuren.

Diese Angaben sind in den nachfolgenden Arbeiten von Embden und Schmitz (diese Zeitschr. 38, 393, 1912), sowie von Kura Kondo (diese Zeitschr. 38, 407, 1912) verwertet worden.

hatte ausgesprochen saure Eigenschaften, sie entwickelte, im trockenen Reagensglas erhitzt, sehr starken Geruch nach Amylamin, woraus gefolgert wurde, daß es sich hier um ein Leucinderivat handelte. Nähere Aufschlüsse konnten bei der minimalen Quantität der gewonnenen Substanz nicht erhalten werden.

Im Jahre 1906 erschien eine Arbeit von Lippich<sup>1)</sup>, in der dieser Autor zeigte, daß die von Baumann und Hoppe-Seyler im Jahre 1874 beschriebene Bildungsweise von Hydantoinensäure durch Kochen einer Lösung von Glykokoll und Harnstoff mit überschüssigem Barytwasser auch auf andere Aminosäuren anwendbar sei.

Insbesondere stellte der Autor die Isobutylhydantoinensäure (Leucinuraminosäure) auf diese Weise mit sehr guter Ausbeute dar.

In einer weiteren Mitteilung wandte Lippich<sup>2)</sup> die gleiche Methode auch auf eine Reihe anderer Aminosäuren an, während er in einer dritten Mitteilung<sup>3)</sup> eine Reihe anderer Bildungsweisen von Uraminosäuren aufführte. Hier sei namentlich hervorgehoben, daß es ihm gelang, unter anderem die dem Leucin und die dem Tyrosin entsprechenden Uraminosäuren durch einfaches Kochen von Harnstoff mit der entsprechenden Aminosäure ohne weiteren Zusatz zu gewinnen.

Schon nach der ersten Mitteilung von Lippich hatte Embden versucht, die bei dem eben erwähnten Versuche erhaltene Substanz aus Blutextrakten, die von neuen Durchblutungsversuchen mit Leucin herrührten, zu gewinnen, in dem Gedanken, daß es sich hier um die Leucinuraminosäure gehandelt haben könnte. An diese Möglichkeit war um so eher zu denken, als es im Gegensatz zu der Angabe von Lippich, daß die Uraminosäure in Äther praktisch unlöslich sei, gelang, Isobutylhydantoinensäure einer wässrigen Lösung durch Extraktion mit Äther zu entziehen.

<sup>1)</sup> Fr. Lippich, Über Isobutylhydantoinensäure und über eine Reaktion zum Nachweis kleiner Mengen von Leucin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 2953, 1906.

<sup>2)</sup> Fr. Lippich, Über Uramidosäuren. II. Mitteilung. Ebenda 41, 2953, 1908.

<sup>3)</sup> Derselbe, Über Uramidosäurebildung. III. Mitteilung. Ebenda 41, 2974, 1908.

Die Wiederauffindung im Durchblutungsblute gelang aber zunächst nicht, oder es wurden doch nur minimale Mengen von Krystallen erhalten, die zu einer Identifizierung nicht ausreichten. Freilich war — seitdem der eingangs geschilderte Versuch angestellt wurde — die chemische Verarbeitung des Durchblutungsblutes eine weit schonendere geworden, namentlich wurde bei diesen neueren Versuchen jedes Erwärmen auf höhere Temperaturen streng vermieden. Die Einengung des neutralen oder ganz schwach sauren, nach Schenck entweißten und entquecksilberten Blutextrakts geschah im Vakuum bei einer 50° nicht überschreitenden Temperatur des Heizwassers. Die eingengte, wässrige Lösung wurde direkt mit Phosphorsäure angesäuert und der Extraktion mit Äther unterworfen.

Nach dem Erscheinen der 2. und 3. Mitteilung von Lippich habe ich neue Versuche angestellt, die in erster Linie entscheiden sollten, ob bei der Durchblutung der Leber mit Leucin Isobutylhydantoinensäure auftritt. Bei der Leichtigkeit, mit der nach den Untersuchungen von Lippich Aminosäuren auch in neutralen, wässrigen Lösungen mit dem im Blute von vornherein vorhandenen und bei der Durchblutung der Leber mit einer Aminosäure vermehrt auftretenden Harnstoff reagieren, war es namentlich nötig, die Möglichkeit, daß bei der Verarbeitung des Blutextraktes Leucinuraminsäure nachträglich als Laborationsprodukt entstände, auszuschließen.

Eine solche Bildung von Uraminosäuren durch einfaches Erwärmen aminosäure- und harnstoffhaltiger tierischer Flüssigkeiten wäre aber auch für den Nachweis von Aminosäuren im Harn, im Blut usw. von nicht unwesentlicher, praktischer Bedeutung. Beginnt doch nach einer vielfach noch üblichen Methode z. B. der Nachweis von Leucin und Tyrosin im Harn von Phosphorvergifteten oder an akuter gelber Leberatrophie Erkrankten damit, daß der Harn auf dem Wasserbade eingedampft, also auf etwa 70 bis 80° erwärmt wird. Auch bei den in den letzten Jahren, namentlich nach dem Erscheinen einer Arbeit von Embden und Reese<sup>1)</sup>, vielfach erfolgten Untersuchungen des normalen Harns auf Aminosäuren wurde

<sup>1)</sup> G. Embden und H. Reese, Über die Gewinnung von Aminosäuren aus normalem Harn. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 411, 1905.

der Harn bisweilen auf dem Wasserbade eingeengt, so in einer Arbeit von Hirschstein<sup>1)</sup>, der zu dem Resultat gelangt, daß im normalen Harn freie Aminosäuren sich nicht finden. Erfolgte bei dem einfachen Erwärmen von aminosäurehaltigem Harn auf 70 bis 80° Uraminosäurebildung in irgend erheblichem Umfange, so wäre es nicht gestattet, einen Harn, in dem Aminosäuren nachgewiesen oder gar der Menge nach geschätzt werden sollen, auf dem Wasserbade einzudampfen.

Meine Versuche haben nun in der Tat ergeben, daß nicht nur beim Kochen des Harns unter Aminosäurezusatz, sondern in Übereinstimmung mit der eingangs erwähnten Arbeit Dakins auch beim einfachen Eindampfen auf dem Wasserbade, ja sogar augenscheinlich auch beim Einengen einer Harnstoff- und Aminosäure enthaltenden neutral reagierenden wässerigen Lösung in Vakuum bei einer 42 bis 45° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers Uraminosäure gebildet wird.

Bei der Ausführung meiner Versuche handelte es sich vor allem darum, eine Methode zu finden, welche es gestattete, geringe Quantitäten Uraminosäure aus größeren Mengen tierischer Flüssigkeiten, namentlich Harn, zu gewinnen. Nach dem eingangs erwähnten Befunde von Embden und Almagia lag es nahe, die Isolierung der (durch Säure in Freiheit gesetzten) Uraminosäuren durch Extraktion mit Äther zu versuchen. Nach älteren von Jaffé<sup>2)</sup> herrührenden Angaben und namentlich nach den neueren Untersuchungen Lippichs sind freilich die Uraminosäuren, insbesondere auch die dem Tyrosin und dem Leucin entsprechenden in Äther unlöslich. Im Gegensatz zu diesen Angaben gelang es mir leicht, die aus Leucin, Tyrosin und Phenylalanin gewonnenen Uraminosäuren aus wässriger Lösung und auch aus Harn und enteweißtem Blut durch Ätherextraktion zu gewinnen.

Ich möchte im folgenden nun zunächst meine Versuche am Harn, dann die an Blutextrakten in einigen Beispielen schildern.

200 ccm Harn wurden unter Zusatz von 1,5 g reinem l-Leucin, das in 75 ccm heißem Wasser gelöst wurde, auf dem

<sup>1)</sup> L. Hirschstein, Die Beziehungen des Glykokolls zur Harnsäure. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 4, 129, 1907.

<sup>2)</sup> M. Jaffé, Über Tyrosinhydantoinensäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 311, 1882/83.

Wasserbade innerhalb 3 Stunden bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in etwa 150 ccm Wasser aufgenommen, nach dem Erkalten mit Schwefelsäure stark angesäuert und im Extraktionsapparat nach Kutscher-Steudel mit Äther extrahiert. Schon nach Verlauf einiger Stunden begannen sich reichlich Krystalle im Äther auszuscheiden. Die Extraktion verläuft sehr langsam<sup>1)</sup>, erfordert jedoch bei Anwendung geeigneter elektrischer Heizplatten kaum Beaufsichtigung.

Sie wurde ununterbrochen 4 Tage fortgesetzt. Nach dieser Zeit wurden die Krystalle von dem Äther durch Filtration getrennt und mit wenig Äther gewaschen. Die Menge der lufttrockenen, schmutzig rötlichen Krystalle betrug 0,38 g. Die Reinigung gelingt äußerst leicht: Die Substanz wird in heißem Wasser gelöst, durch Kochen mit wenig Tierkohle wird die Lösung völlig entfärbt und auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Krystallisation eingeengt. Die nach Vollendung der Krystallisation in der Kälte gewonnene Substanz wog 0,2 g.

Die Substanz schmolz im offenen Capillarrohr unter Gasentwicklung scharf bei 202° (unkorrigiert). Den gleichen oder doch von dem oben genannten nur um etwa 1° verschiedenen Schmelzpunkt habe ich für mehrere andere aus Leucinpräparaten verschiedener Darstellung gewonnene Uraminosäurepräparate festgestellt<sup>2)</sup>, mochte die Uraminosäure durch Kochen mit wässriger Harnstofflösung oder durch Erwärmen mit Harn gewonnen sein. Freilich waren sämtliche Leucinpräparate aus Casein dargestellt<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Weit rascher verläuft die Extraktion bei Anwendung eines Extraktionsapparates nach Lind.

<sup>2)</sup> Siehe hierzu Lippich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 2963, 1908.

<sup>3)</sup> Hier sei erwähnt, daß der Schmelzpunkt der d-l-Leucinuraminosäure wesentlich tiefer liegt. Beim Erhitzen im offenen Capillarrohr bei 189 bis 190° (unkorr.). Ich konnte dies an Präparaten von verschiedener Provenienz feststellen. Mehrere Präparate waren aus einem von Kahlbaum bezogenen synthetischen Leucin gewonnen, ein weiteres war durch Racemisierung mittels Barytwasser aus natürlichem Leucin dargestellt.

Es ist sehr auffällig, daß Lippich in der ersten seiner drei oben erwähnten Arbeiten eine Leucinuraminosäure vom Schmelzpunkt 205° erhielt (Ber. 39, S. 2954), während er in seinen späteren Mitteilungen nur Isobutylhydantoinensäure von wesentlich niederen Schmelzpunkten erhielt; so gewann er in seiner zweiten Mitteilung (l. c. S. 2964) aus Leucinpräparaten, die auf verschiedenem Wege aus Casein, sowie aus Häm-

Die weitere Identifizierung der gewonnenen Substanz erfolgte durch Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.

Aus den eben geschilderten und einer Reihe weiterer völlig gleichartig verlaufender Versuche geht hervor, daß das Eindampfen von Harn auf dem Wasserbade zum Zwecke der Isolierung freier Aminosäuren oder als Vorbereitung der Darstellung ihrer Benzoyl-, Naphthalinsulfo-, Naphthylisocyanat-Derivate durchaus unstatthaft ist<sup>1)</sup>.

Die Menge der gebildeten Uraminosäuren ist keineswegs gering anzuschlagen, zumal bei der Extraktion mit Ather und der Reinigung der Substanz sicherlich ein erheblicher Teil verloren geht.

Ich will nur noch hervorheben, daß die native schwach saure Reaktion des verwendeten Harns, die während der ganzen Zeit des Eindampfens bestehen bleiben kann, im Verlaufe der Uraminosäurebildung keineswegs stört. Essigsäurezusatz scheint dagegen nach Dakin (l. c. S. 30) die Uraminosäurebildung zu verhindern.

Weit größer als bei dem Eindampfen des Harns auf dem Wasserbade wird die Ausbeute an Leucinuraminosäure bei mehrstündigem Kochen auf dem Drahtnetz, wie das von vornherein nach den Untersuchungen von Lippich zu erwarten war.

Wie bereits oben erwähnt, bleibt aber anscheinend auch die Uraminosäurebildung nicht aus, wenn die Temperatur beim Einengen der aminosäurehaltigen Flüssigkeit 42 bis 45° nicht übersteigt. Freilich erfolgte hier die Bildung der Uraminosäure

globin erhalten worden waren, Uraminosäuren, deren Schmelzpunkt zwischen 188 und 193° schwankte, und auch in seiner dritten Mitteilung stellte Lippich durch einfaches Kochen von Leucin mit Harnstofflösung ein bei 188 bis 189° schmelzendes Uraminosäurepräparat dar.

Lippich ist geneigt, die eben erwähnten Schmelzpunktsdifferenzen sowie auch einige von ihm beobachtete Löslichkeitsunterschiede verschiedener Uraminosäuren auf einen verschiedenen Bau der zugrunde liegenden Leucine zurückzuführen.

Ich möchte es als höchst wahrscheinlich bezeichnen, daß die Präparate von Lippich, die bereits zwischen 188 und 193° schmolzen, alle mehr oder weniger vollständig racemisiert waren, was recht gut der zu Eingang dieser Bemerkung gemachten Angabe über den Schmelzpunkt der Isobutylhydantoinensäure aus d-l-Leucin (189 bis 190°) entsprechen würde.

<sup>1)</sup> Siehe hierüber auch Dakin, l. c.

nur in so geringer Menge, daß eine strenge Identifikation nicht vorgenommen werden konnte.

In dem zu Eingang erwähnten Versuche von Embden und Almagia, in dem augenscheinlich Leucinuraminsäure ins Atherextrakt übergegangen war, war die chemische Behandlung des Blutes keineswegs eine so schonende gewesen, vielmehr waren die entweißten Blutextrakte während der Verarbeitung auf Wasserbadtemperatur erwärmt worden. In den späteren Durchblutungsversuchen mit Leucin, bei denen jede Erwärmung der Blutextrakte über Temperaturen von 50° streng vermieden wurde, ließ sich die Uraminosäure des Leucins nicht oder doch nicht mit voller Sicherheit nachweisen.

Konnten also Anhangspunkte für das Auftreten von Isobutylhydantoinensäure bei der Durchblutung der Leber mit leucin-haltigem Blute nicht gewonnen werden, so kommt doch, wie ich glaube, den vorliegenden Untersuchungen ein über diesen negativen Befund hinausgehendes Interesse zu.

Daß man aminosäurehaltigen Harn — oder andere Aminosäure und Harnstoff enthaltende Flüssigkeiten — nicht ohne Verlust an freier Aminosäure bei irgend höherer Temperatur einengen darf, wurde in Übereinstimmung mit Dakin eben erwähnt.

Ebenso ist auch bereits von Dakin hervorgehoben worden, daß die bisherigen Befunde einer Uraminosäurebildung im Tierkörper als nicht beweisend anzusehen sind, so daß ich auf diesen Punkt nicht weiter einzugehen brauche.

Ausschließlich die von ihm selber beobachtete Ausscheidung von Phenylalaninuraminsäure im Katzenharn nach intravenöser Injektion größerer Mengen von Phenylalanin sieht Dakin als beweisend für die Fähigkeit des Organismus an, die Uraminosäuresynthese zu vollziehen. In diesen Versuchen schied sich nämlich direkt aus dem Harn ohne jede Vorbehandlung desselben eine krystallinische Substanz aus, deren Identität mit der dem Phenylalanin entsprechenden Uraminosäure Dakin als sicher ansieht. Doch scheint mir eine Wiederholung auch dieses Versuchs sehr wünschenswert zu sein.

Die Fähigkeit des Leucins, mit Harnstoff unter Bildung der schwer wasserlöslichen Uraminosäure zu reagieren, ist bereits von Lippich dazu benutzt worden, um geringe Mengen Leucin

nachzuweisen. Nach meinen Untersuchungen am Leucin, am Phenylalanin und auch am Tyrosin möchte ich die Uraminosäurebildung als ein ausgezeichnetes Mittel zum Nachweise der drei genannten Aminosäuren, namentlich wenn sie einzeln vorhanden sind, empfehlen. Beim Harn ist es nur nötig, ihn einige Stunden unter allmählicher Einengung auf dem Drahtnetze zu kochen, um einen großen Teil der Aminosäure in Uraminosäure überzuführen. Nach dem Ansäuern wird unter Umständen die Leucinuraminsäure ohne weiteres zu einem Teil ausfallen (Lippich). Der in Lösung bleibende Anteil dieser Substanz, sowie auch die entsprechenden Verbindungen des Phenylalanins und Tyrosins können durch Extraktion mit Äther mittels eines passenden Extraktionsapparats leicht isoliert werden. Bei irgend größerer Konzentration scheiden sie sich schon während der Ätherextraktion im Extraktionskolben krystallinisch aus. Dieses Verfahren ist um so mehr zu empfehlen, als eine Reihe anderer Uraminosäuren, z. B. die des Glykokolls, des Alanins, des Cystins nach Versuchen, die Griesbach im hiesigen Institut angestellt hat, weit schwerer als die eben genannten ätherlöslich sind.

---



# Über synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber.

## II. Mitteilung.

Von

Gustav Embden und Ernst Schmitz.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1911.)

Vor kurzem teilten wir mit, daß es uns gelungen sei, bei der künstlichen Durchströmung der Hundeleber unter Zusatz der Ammoniaksalze verschiedener  $\alpha$ -Ketosäuren zum Durchblutungsblute die diesen  $\alpha$ -Ketosäuren entsprechenden  $\alpha$ -Aminosäuren zu gewinnen<sup>1</sup>).

Insbesondere konnte nach Durchströmung unter Zusatz von Brenztraubensäure in Form ihres Ammoniaksalzes Alanin, nach Durchströmung mit dem Ammoniaksalze der Phenylbrenztraubensäure Phenylalanin, mit dem Ammoniaksalz der p-Oxyphenylbrenztraubensäure Tyrosin aus dem Durchblutungsblute dargestellt werden.

Ferner wurde bereits in der eben erwähnten Mitteilung das Auftreten von Leucin bei Zusatz von  $\alpha$ -oxyisocaproinsaurem Ammoniak wahrscheinlich gemacht.

In der vorliegenden Arbeit sollen in erster Linie die notwendigen experimentellen Einzelheiten dieser Versuche mitgeteilt werden.

In zweiter Linie möchten wir über einige neue Versuche, insbesondere über die Bildung von Leucin aus der ihm entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäure berichten.

---

<sup>1</sup>) G. Embden und E. Schmitz, Über synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber. Diese Zeitschr. 29, 423, 1910.

In der auf diese folgenden Arbeit von Kura Kondo sollen Versuche über die Entstehung einiger körperfremder Aminosäuren aus den Ammoniaksalzen der entsprechenden Ketsäuren bei der Durchblutung der Leber mitgeteilt werden.

Eine dritte, von Hanni Fellner herrührende, in unserer früheren Mitteilung bereits kurz erwähnte Untersuchung soll die Bildung von Alanin aus Glykogen und Ammoniak bei der Leberdurchblutung dartun.

#### Methodisches.

Die Technik der Durchblutung wich nicht wesentlich von der in unseren früheren Versuchen angewandten ab. Wir bedienten uns auch hier des in manchen Einzelheiten abgeänderten Mandelschen Durchblutungsapparates.

Im Gegensatz zu vielen früheren Versuchen wurde in der vorliegenden Arbeit fast ausschließlich Hundeblood zur Durchströmung verwendet. Die Anwendung von Hundeblood und damit eine den natürlichen Verhältnissen möglichst nahekommende Art der Durchströmung schien uns in dieser Untersuchungsreihe besonders erwünscht, um etwa während der Durchblutung einsetzende autolytische Vorgänge, die zur Bildung größerer Mengen freier Aminosäuren führen konnten, nach Möglichkeit einzuschränken.

Das Hundeblood wurde unmittelbar vor den einzelnen Durchblutungsversuchen, zu denen ausschließlich die Lebern kleinerer Hunde dienten, von einem oder mehreren größeren Hunden durch Entbluten aus den Carotiden in Äthernarkose gewonnen. Das defibrierte und kolierete Blut kam teils ohne Verdünnung zur Anwendung, teils wurden geringe Mengen Kochsalzlösung von 0,85% hinzugefügt.

Die Dauer der Durchblutung betrug im allgemeinen 90 Minuten. Die Zusatzsubstanz wurde zu Beginn des Versuchs, in möglichst wenig Wasser gelöst, auf einmal dem Blute zugefügt.

Von den in unseren Versuchen verwendeten Ketsäuren wurde die Brenztraubensäure von Kahlbäum käuflich bezogen, die übrigen Substanzen von uns selber dargestellt.

Die Darstellung der  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure geschah durch Einleiten von Äthylnitritgas in eine alkoholische Lösung von 2,3 g Natrium und

18,6 g Isobutylacetessigester<sup>1)</sup> und Spaltung des so erhaltenen  $\alpha$ -Oxyminoisocapronsäureäthylesters mit Nitrosylschwefelsäure in ameisen-saurer Lösung<sup>2)</sup>.

Die  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure besaß den von Locquin<sup>3)</sup> angegebenen Siedepunkt 84° unter 14 mm Druck.

Die p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurde nach dem ursprünglichen Verfahren von Neubauer<sup>4)</sup> gewonnen und schmolz bei 220°.

Die Phenylbrenztraubensäure wurde durch Kochen [des Azlactons aus Benzaldehyd und Hippursäure erhalten und schmolz bei 155° entsprechend den Angaben von Plöchel<sup>5)</sup> und Erlenmeyer<sup>6)</sup>.

Die Darstellung der d-l- und der l-Leucinsäure erfolgte aus d-l-Leucin, bezügl. aus l-Leucin nach den früher von Fritz Sachs<sup>7)</sup> gemachten Angaben.

Über die weiteren Einzelheiten der Durchblutungsversuche gibt die umstehende Tabelle Aufschluß.

Am Schlusse des Versuches wurde das Blut in bekannter Weise nach Schenck mit Salzsäure und Sublimat gefällt; ebenso wurde auch die möglichst rasch mit einer Fleischhackmaschine zerkleinerte Leber behandelt.

Am Morgen nach dem Versuch wurden die gewonnenen Flüssigkeiten mittels großer Nutschen filtriert, durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber und durch einen Luftstrom vom überschüssigen Schwefelwasserstoff befreit. Nach Abtrennung des Quecksilbersulfids wurden die gewonnenen klaren und farblosen Flüssigkeiten gemessen, mit Natronlauge möglichst genau neutralisiert und in einem Verdunstkasten nach Faust

<sup>1)</sup> Bouveaue et Locquin, Einwirkung der salpetrigen Säure in alkalischer Lösung auf  $\alpha$ -substituierte  $\beta$ -Ketonsäureester. Compt. rend. de l'Acad. des sciences 135, 295, 1902.

<sup>2)</sup> Bouveaue et Locquin, Darstellung der  $\alpha$ -Ketonsäureester und  $\alpha$ -Ketonsäuren aus den  $\alpha$ -Oxyminoestern. Bull. de la Sociétéc him. (3) 31, 1142, 1904.

<sup>3)</sup> Locquin, Über die  $\alpha$ -Ketonsäuren und  $\alpha$ -Ketonsäureester. Bulletin de la Sociétéc chimique 3, 1147, 1904.

<sup>4)</sup> O. Neubauer, Über den Abbau der Aminosäuren im gesunden und kranken Organismus. Arch. f. klin. Med. 95, 230, 1909.

<sup>5)</sup> Plöchel, Über Phenylglycoinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 16, 2807, 1883.

<sup>6)</sup> Erlenmeyer, Zur Kenntnis der Phenylbrenztraubensäure. Annal. d. Chem. 271, 165, 1892.

<sup>7)</sup> Fritz Sachs, Über den Chemismus des Leucinabbaus in der Leber. Diese Zeitschr. 27, 27, 1910.

1 Nr.	2 Der Durchströmungs- flüssigkeit zugefügte Substanz	3 Durchströmungs- flüssigkeit	4 Gewicht der Leber vor der Durch- blutung g	5 Dauer der Durch- blutung Minuten
1	6,4 g p-Oxyphenyl- brenztraubensäure in NH <sub>3</sub> gelöst	1200 ccm Hundeblut, 200 ccm NaCl-Lös. von 0,85%	238	90
2	12 g Brenztraubensäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert	780 ccm Hundeblut + 300 ccm NaCl-Lös. von 0,85%	155	75
3	10 g Brenztraubensäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert	1400 ccm Rinderblut	150	75
4	15 g Brenztraubensäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert	1300 ccm Hundeblut	195	90
5	15 g Brenztraubensäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert	1240 ccm Hundeblut	156	90
6	6,7 g Phenylbrenz- traubensäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert	860 ccm Hundeblut, 340 ccm Kochsalzlösung	114	90
7	5,7 g Phenylbrenz- traubensäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert	1050 ccm Hundeblut, 250 ccm Kochsalzlösung	155	90
8	8,5 g Isopropylbrenz- traubensäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert	1150 ccm Hundeblut, 200 ccm Kochsalzlösung	240	90
9	6,2 g Isopropylbrenz- traubensäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert	1070 ccm Hundeblut, 100 ccm Kochsalzlösung	259	90
10	5,3 g d-l-Leucinsäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert	880 ccm Hundeblut, 370 ccm Kochsalzlösung	180	90
11	8,5 g l-Leucinsäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert	900 ccm Hundeblut, 250 ccm Kochsalzlösung	133	90

durch einen kräftigen Ventilatorstrom möglichst rasch auf einige hundert Kubikzentimeter eingeengt. Hierzu war bei den 6 Liter und mehr betragenden Flüssigkeitsmengen nur ein Arbeitstag erforderlich. Die Flüssigkeit erwärmte sich bei der Verdunstung nicht über 34 bis 37°, was wegen der bei höherer Temperatur leicht eintretenden Uraminosäurebildung aus Harnstoff und Aminosäure von wesentlicher Bedeutung ist. Die auf 200 bis 300 ccm eingeengte Flüssigkeit wurde nun zur Entfernung der Hauptmengen ätherlöslicher Säuren bei schwefelsaurer Reaktion im Lindschen Extraktionsapparat etwa einen

Tag lang mit Äther extrahiert. Eine ganz vollständige Entfernung der ätherlöslichen Säuren war im allgemeinen nicht notwendig. Die weitere chemische Verarbeitung war verschieden, je nachdem die gesuchte Aminosäure als  $\beta$ -Naphthalinsulfon oder als Uraminosäure isoliert werden sollte.

Als  $\beta$ -Naphthalinsulfone wurden in der vorliegenden Arbeit Tyrosin und Alanin, als Uraminosäuren Leucin und Phenylalanin gewonnen.

Sollte die gesuchte Aminosäure als  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung isoliert werden, so wurde die mit Äther extrahierte Flüssigkeit mit starker Natronlauge zunächst neutralisiert und dann noch mit etwa 5 ccm Natronlauge von 33% im Überschuß versetzt. Jetzt wurde das Ammoniak durch mehrstündige Destillation im Vakuum bei einer 34° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers entfernt, um das Auftreten störender Mengen von  $\beta$ -Naphthalinsulfamid bei der nachherigen Schüttelung mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid zu vermeiden.

Nach Beendigung der Vakuumdestillation wurde vom ausgeschiedenen Phosphatniederschlag abfiltriert, die Flüssigkeit mit Wasser auf 500 bis 600 ccm aufgefüllt, mit Salzsäure neutralisiert und nun soviel starke Natronlauge zugefügt, bis rotes Lackmuspapier intensiv blau gefärbt wurde. Hierzu genügten etwa 1 bis 2 ccm Natronlauge von 33%.

Jetzt wurde die Flüssigkeit mit etwa 50 ccm einer 10%-tigen ätherischen Lösung von  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid und mit einer zur Verhinderung der Ausfällung des Reagens beim Schütteln ausreichenden Menge Äther versetzt und auf der Schüttelmaschine bei einer Temperatur von etwas über 20° geschüttelt. Von Zeit zu Zeit wurde geprüft, ob noch genügend stark alkalische Reaktion bestand, eventuell etwas Natronlauge hinzugefügt.

Nach etwa 12 bis 15stündigem Schütteln wurden wässrige und ätherische Flüssigkeitsschicht getrennt, wobei sich bisweilen die Anwendung einer Zentrifuge als notwendig erwies. Die weitere Verarbeitung war verschieden, je nachdem es sich um den Nachweis von Tyrosin oder von Alanin handelte.

Wir schildern zunächst den Nachweis des Tyrosins nach Durchströmung mit dem Ammoniaksalz der p-Oxyphenylbrenz-

traubensäure. Die Einzelheiten des Tierversuchs sind aus der Tabelle (Versuch Nr. 1) ersichtlich<sup>1)</sup>.

In diesem Versuch war während des Schüttelns mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid ein auffallend starker Niederschlag entstanden.

Der Niederschlag wurde mit Hilfe der Zentrifuge von der Flüssigkeit getrennt, mit etwas kaltem Wasser gewaschen, in einen Scheidetrichter übergespült, die wässrige Suspension mit Salzsäure versetzt, wobei sich der bis dahin körnige Niederschlag ölig umwandelte. Das Öl wurde beim Schütteln mit Äther sehr leicht von diesem aufgenommen. Das Schütteln mit Äther wurde noch zweimal wiederholt und aus den vereinigten, mit wenig Wasser gewaschenen und filtrierten Ätherextrakten der Äther durch Destillation verjagt.

Das zurückbleibende Öl wurde in wenig Alkohol aufgenommen. Die alkoholische Lösung wurde in das etwa vierfache Volumen kalten Wassers gegossen. Die dabei zunächst in feinen Tröpfchen sich ausscheidende Substanz begann nach kurzem Stehen im Eisschrank zu krystallisieren.

Am nächsten Morgen wurden die Krystalle abgesaugt und mit Wasser mehrfach gewaschen. Die Menge der lufttrockenen rein krystallinischen Substanz betrug 0,50 g. Die Substanz begann bei 116° zu sintern und schmolz ziemlich scharf bei 126 bis 127°. Bei 128 bis 129° begann sie aufzuschäumen. Ein durch Behandeln von l-Tyrosin aus Casein mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid gewonnenes Präparat von Dinaphthalinsulfotyrosin hatte denselben Schmelzpunkt.

Die alkoholische Lösung der Substanz drehte die Ebene des polarisierten Lichtes stark nach rechts.

---

<sup>1)</sup> Beim Einengen des entquecksilberten und von Schwefelwasserstoff befreiten, neutral reagierenden Blutextrakts im Ventilator schied sich in geringer Menge eine krystallisierte Substanz aus, die in kaltem Wasser fast unlöslich, leichter löslich in heißem Wasser war. In Ammoniak löste sie sich sehr leicht, um beim Verdunsten des Ammoniaks in Form von büschelförmig angeordneten Nadeln wieder zu krystallisieren.

Auch diese umkrystallisierte Substanz gab sehr deutlich die Millonsche Reaktion. Allem Anschein nach handelte es sich um Tyrosin; eine strenge Identifikation des freien Tyrosins war allerdings bei der geringen Menge der Substanz nicht möglich.

Ein Teil der Substanz wurde bei 102° getrocknet und zu einer Elementaranalyse benutzt.

0,1312 g Substanz gaben  
0,2966 g CO<sub>2</sub> und 0,0512 g H<sub>2</sub>O.

	C	H
Gefunden:	61,65%	4,34%
Berechnet für (C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> N:	62,03%	4,09%

Wie man sieht, stimmen die gewonnenen Analysenzahlen mit denen des Dinaphthalinsulfotyrosins überein.

Aus der beobachteten starken Rechtedrehung der alkoholischen Lösung und aus dem Schmelzpunkt des Dinaphthalinsulfotyrosins geht hervor, daß die bei der Durchblutung aufgetretene Aminosäure das natürliche l-Tyrosin war, das, wie wir besonders feststellten, in alkoholischer Lösung die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts dreht.

Es sei noch erwähnt, daß auch bei fast allen folgenden Versuchen während der Schüttelung der Blut- und Leberextrakte mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid schon bei alkalischer Reaktion mehr oder weniger erhebliche Niederschläge auftraten.

Wir verarbeiteten diese Niederschläge in einer Reihe von Fällen genau in der eben geschilderten Weise weiter, ohne daß es uns jemals gelang, Dinaphthalinsulfotyrosin oder eine andere kristallisierte  $\beta$ -Naphthalinsulfaminosäure daraus zu gewinnen.

In vier Versuchen (Nr. 2 bis 5 der Tabelle) wurde die Durchblutung mit verschiedenen Mengen von brenztraubensaurem Ammoniak vorgenommen.

Stets gelang hier die Gewinnung von  $\beta$ -Naphthalinsulfoalanin aus dem Durchblutungsblute.

Die Verarbeitung des Durchblutungsblutes und der Leber war hier zunächst genau die gleiche wie nach der Durchströmung mit p-Oxyphenylbrenztraubensäure.

Aus dem bereits während des Schüttelns mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid bei alkalischer Reaktion auftretendem Niederschlag ließ sich, wie bereits eben erwähnt, eine einheitliche Substanz nicht gewinnen.

Die von diesem Niederschlag und vom Äther getrennte alkalische klare Flüssigkeit wurde im Schütteltrichter mit Salz-

säure angesäuert, wobei regelmäßig eine sehr starke, milchige Fällung eintrat. Das ausgefällte Reaktionsprodukt wurde sofort in Äther aufgenommen und die Ausschüttelung mit Äther noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Ätherextrakte wurden unter Zusatz von etwa 20 ccm Wasser destilliert, wobei eine reichliche Menge Öl hinterblieb.

Der Destillationsrückstand wurde in der Kälte mit Ammoniak bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzt, wobei bei weitem die Hauptmasse (bisweilen auch alles) in Lösung ging.

Das ungelöst Bleibende nahm alsbald krystallinische Beschaffenheit an. Die Krystalle bestanden aus  $\beta$ -Naphthalinsulfamid. Diese Substanz konnte in der früher von Embden<sup>1)</sup> angegebenen Weise leicht und ohne Verlust an  $\beta$ -Naphthalinsulfoaminosäuren durch öfter wiederholtes Schütteln der ammoniakalischen Flüssigkeit mit Äther beseitigt werden<sup>2)</sup>.

Die amidfreie Flüssigkeit wurde wiederum im Scheidetrichter mit Salzsäure angesäuert, das ausfallende Öl in Äther aufgenommen und die Ätherschüttelung noch zweimal wiederholt.

Die vereinigten Ätherauszüge wurden drei- bis viermal mit ganz geringen Mengen Wasser gewaschen und dann der Äther unter Zusatz von etwa 20 ccm Wasser wiederum verjagt.

Der Destillationsrückstand wurde nach dem Erkalten möglichst genau mit Ammoniak neutralisiert, wobei eine völlig klare, mehr oder weniger gelb gefärbte Flüssigkeit resultierte, auf etwa 40 bis 50 ccm (bei sehr reichlich vorhandenen Reaktionsprodukten auf mehr) aufgefüllt und mit Bariumchloridlösung von 10% unter Vermeidung eines größeren Überschusses ausgefällt.

Der voluminöse Barytniederschlag wurde mittels einer kleinen Nutsche abgetrennt und mit ganz wenig kaltem Wasser gewaschen.

Das nahezu farblose Filtrat wurde wiederum in einem kleinen Scheidetrichter mit Salzsäure angesäuert, die in Freiheit gesetzten Naphthalinsulfoaminosäuren in der geschilderten Weise

---

<sup>1)</sup> A. Bingel, Über die Gewinnung von Glykokoll aus normalem Blut. Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 385, 1908.

<sup>2)</sup> Stets wird schon beim ersten kurzdauernden Schütteln mit Äther die Flüssigkeit vollkommen klar, die weiteren Schüttelungen dienen nur noch zur Beseitigung geringer gelöst gebliebener Amidmengen.



mit Äther aufgenommen und aus den mit ganz wenig Wasser mehrfach gewaschenen Ätherextrakten wieder unter Zusatz von etwas destilliertem Wasser der Äther verjagt.

Nunmehr wurde der Rückstand mit Wasser auf etwa 40 bis 60 ccm aufgefüllt, auf dem Wasserbade unter häufigem Schütteln etwa 10 Minuten erwärmt, wobei ein großer Teil des Öls in Lösung ging, und heiß filtriert.

Die bei Beginn des Erhaltens sich ölig trübende Flüssigkeit wird — am besten in kleinen Portionen — rasch vollends abgekühlt und mit einigen Kryställchen  $\beta$ -Naphthalinsulfo-d-Alanin geimpft. Gewöhnlich beginnt fast augenblicklich die Krystallisation, die beim Stehen im Eisschrank vollständiger wird. Jedoch ist diese erste Krystallisation meist nicht frei von öligen Beimengungen.

Zur Reinigung wird die gewonnene Substanz entweder nochmals aus heißem Wasser in der eben geschilderten Weise krystallisiert oder in wenigen Kubikzentimetern kalten Alkohols aufgelöst und die Lösung unter Umrühren in etwa das zehnfache Volumen kalten Wassers gegossen und wiederum mit einigen Kryställchen  $\beta$ -Naphthalinsulfoalanin geimpft.

Aus dem bei der ersten Extraktion mit heißem Wasser ungelöst gebliebenen Rückstand läßt sich durch ein- oder mehrmalige Wiederholung der genannten Extraktion noch mehr krystallinische Substanz gewinnen, doch gelingt die Reinigung der bei der zweiten und dritten Extraktion gewonnenen Substanz immer nur schwer<sup>1)</sup>.

Die Ausbeute an analysenreiner, krystallinischer Substanz war eine ziemlich wechselnde, das Umkrystallisieren aus heißem Wasser mit außerordentlich großen Verlusten verbunden. Sie betrug in Versuch 5 immerhin 0,75 g.

Die Krystalle hatten teils die Form sichelförmig gebogener Blättchen, teils die dünner, rechteckiger Platten.

Die Substanz enthielt Krystallwasser und verlor einen Teil desselben sehr leicht. Der Schmelzpunkt der lufttrockenen Substanz wurde wohl aus diesem Grunde bei verschiedenen

---

<sup>1)</sup> Die Schüttelung der Blut- und Leberextrakte mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid wurde nach jeweiliger Entfernung der entstandenen Reaktionsprodukte so lange fortgesetzt, bis bei weiterem, mindestens 12 Stunden fortgesetztem Schütteln Reaktionsprodukte nur noch in Spuren auftraten.

Präparaten nicht ganz übereinstimmend gefunden. Ein oftmals umkrystallisiertes Präparat begann bei 54° zu sintern und schmolz bei 61° (unkorrigiert). Beim Erwärmen auf Temperaturen über 82° wurde die Substanz öfters wieder teilweise krystallinisch.

Die Substanz drehte in alkoholischer und ammoniakalischer Lösung stark nach links. Zur Analyse wurde sie im Schiffchen bei 105° getrocknet: 0,1405 g verloren hierbei 0,0151 g Wasser.

	Gefunden: 10,75%	H <sub>2</sub> O
Berechnet für C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> NS + 2 H <sub>2</sub> O:	11,43%	H <sub>2</sub> O

Die Elementaranalyse hatte folgendes Ergebnis: 0,1254 g Substanz gaben 0,2554 g CO<sub>2</sub> und 0,0528 g H<sub>2</sub>O.

	C	H
	Gefunden: 55,54%	4,68%
Berechnet für C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> NS:	55,91%	4,66%

Wie man sieht, stimmen die gewonnenen Analysenzahlen mit denen des  $\beta$ -Naphthalinsulfoalanins überein.

Wie bereits erwähnt, drehte das gewonnene Naphthalinsulfoprodukt in alkoholischer und ammoniakalischer Lösung nach links: Es war also bei der Durchblutung der Leber das natürliche d-Alanin aufgetreten.

Einfacher noch als der Nachweis des Tyrosins und des Alanins gestaltete sich der des Leucins und des Phenylalanins nach Durchströmung mit den entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäuren.

Diese beiden Substanzen wurden als Uraminosäuren nachgewiesen. Die zur Gewinnung der Phenylalaninuraminsäure und der Leucinuraminsäure angewandte Methode war bis in alle Einzelheiten die gleiche.

Bis zur Extraktion der eingeeengten Blut- und Leberextrakte mit Äther zur Entfernung ätherlöslicher Säuren unterschied sich das Verfahren nicht von dem oben für den Nachweis des Tyrosins und Alanins geschilderten.

Nach der Ätherextraktion wurde die wässrige Flüssigkeit mit Natronlauge neutralisiert, in einen Rundkolben gebracht, mit 10 g Harnstoff versetzt, zunächst zur Verjagung des gelösten Äthers vorsichtig auf dem Wasserbade erwärmt, dann etwa 10 bis 12 Stunden auf freier Flamme in gelindem Sieden erhalten.

Nach dem Abkühlen wurde wiederum mit Schwefelsäure stark angesäuert und die Flüssigkeit abermals, entsprechend den in der voranstehenden Arbeit von Weiland<sup>1)</sup> gemachten Erfahrungen, im Lindschen Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Schon nach ziemlich kurzer Zeit schied sich in dem Extraktionskölbohen eine krystallinische Substanz ab, deren Menge allmählich zunahm<sup>2)</sup>.

Die Extraktion wurde nach etwa 12 bis 15stündiger Dauer unterbrochen. Eine zweite Extraktion lieferte nur noch geringe Mengen der gesuchten Substanz.

Nach dem Erkalten des Äthers wurden die Kristalle abfiltriert, mit wenig Äther gewaschen, und das ätherische Filtrat auf dem Wasserbade bis auf wenige Kubikzentimeter eingeeengt, wobei sich abermals eine geringe Menge von Krystallen abschied, die mit der ersten Krystallisation vereinigt wurden.

Die Reinigung der Substanz erfolgte durch ein- oder zweimaliges Umkrystallisieren aus heißem Wasser, eventuell unter Zusatz von etwas Tierkohle.

Mit Phenylbrenztraubensäure wurden zwei Versuche angestellt, Nr. 6 und 7 der Tabelle.

Die Ausbeute an nicht umkrystallisierter Substanz betrug in dem Versuch 6: 0,34 g, im Versuch 7: 0,52 g.

Nach einmaligem Umkrystallisieren schmolz die aus Versuch 6 gewonnene Substanz bei 178 bis 179° unter Gasentwicklung, die aus Versuch 7 dargestellte zwischen 179 und 180° (unkorrigiert), nachdem sie bei 174° zu sintern begonnen hatte.

Die Uraminosäure des racemischen Phenylalanins schmilzt nach Dakin bei 188 bis 190°, bei raschem Erhitzen bei 190 bis 191°.

Das optische Verhalten wurde an den aus den eben erwähnten Versuchen isolierten Substanzen nicht untersucht. Jedoch wurde diese Untersuchung gelegentlich einiger späterer,

---

<sup>1)</sup> W. Weiland, Beitrag zur Lehre von der Uraminosäurebildung. Diese Zeitschr. 38, 389.

<sup>2)</sup> In den beiden Versuchen, in denen sich beim Kochen mit Harnstoff Leucinuraminsäure gebildet hatte, schied sich diese Substanz übrigens zum Teil schon bei der Sättigung der sauren und stark salzhaltigen Flüssigkeit mit Äther an der Grenze der ätherischen und wässrigen Schicht aus.

zu anderen Zwecken von Dr. Baldes unternommener Durchströmungsversuche mit dem Ammoniaksalz der Phenylbrenztraubensäure nachgeholt. Auch in diesen — übrigens unter Anwendung von Rinderblut ausgeführten — Versuchen wurde  $\beta$ -Phenyl- $\alpha$ -Uraminopropionsäure nach dem eben geschilderten Verfahren in reichlicher Menge isoliert. Der Schmelzpunkt der Uraminosäure lag bei 179 bis 180° (Beginn des Sinterns bei 174°), war also mit dem der aus unseren Versuchen 6 und 7 isolierten Substanzen identisch.

Die wässrige Lösung des Ammoniaksalzes drehte die Ebene es polarisierten Lichts stark nach rechts.

Mit der aus Versuch 7 gewonnenen Substanz wurde eine Elementaranalyse vorgenommen: 0,1280 g der bei 85° zur Gewichtskonstanz getrockneten Substanz gaben 0,2712 g CO<sub>2</sub> und 0,0662 g H<sub>2</sub>O.

	C	H
Gefunden:	57,78%	5,75%
Berechnet für C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :	57,69%	5,77%

Wie man sieht, stimmen die gewonnenen Werte mit den für die Uraminosäure des Phenylalanins berechneten überein.

Es hatte sich also bei der Durchströmung der Leber mit Phenylbrenztraubensäure Phenylalanin — und zwar auch hier eine optisch aktive Form — gebildet.

In zwei Versuchen, Versuch 8 und 9 der Tabelle, wurde dem Durchblutungsblut das Ammoniaksalz der  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (Isopropylbrenztraubensäure) hinzugefügt.

Jedesmal gelangten wir auch hier zu einer schön krystallisierten Uraminosäure.

Die Ausbeute an reiner Uraminosäure war von ähnlicher Größenordnung wie in den geschilderten Versuchen mit Phenylbrenztraubensäure.

Sie betrug in Versuch 8 0,23 g, in Versuch 9 ging ein größerer Teil der Substanz vor der Wägung durch einen Unfall verloren. Die Substanz aus Versuch 8 wurde zu einer Elementaranalyse verwandt.

Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus heißem Wasser schmolz sie unter lebhafter Gasentwicklung bei 203°.

Die Elementaranalyse hatte folgendes Ergebnis: 0,1180 g der zur Gewichtskonstanz getrockneten Substanz gaben 0,2078 g  $\text{CO}_2$  und 0,0866 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

	C	H
Gefunden:	48,03%	8,15%
Berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ :	48,27%	8,05%

Die Ergebnisse der Elementaranalyse stimmen also sehr gut zur Leucinuraminosäure.

Der Schmelzpunkt von  $203^\circ$  (unkorr.) beweist, daß es sich hier um optisch aktive Leucinuraminosäure handelte. (Schmelzpunkt der Uraminosäure aus natürlichem Leucin nach Weiland:  $202^\circ$  [unkorr.] und Schmelzpunkt der Uraminosäure aus racemischem Leucin:  $189^\circ$ ).

Von einer direkten polarimetrischen Untersuchung der ziemlich geringen Substanzmenge haben wir abgesehen, da nach Lippich<sup>1)</sup> die Uraminosäure aus optisch aktivem Leucin nur ein so geringes Drehungsvermögen besitzt, daß sich die optische Aktivität nur bei sehr großen Konzentrationen feststellen läßt.

Immerhin dürfen wir nach Analogie mit den Tyrosin- und Alaninversuchen annehmen, daß es sich auch hier um die Bildung von natürlichem l-Leucin und nicht um eine solche von dessen optischen Antipoden handelte.

Im Anschluß an die Versuche mit  $\alpha$ -Ketoisocaprinsäure wollen wir noch ganz kurz über zwei Versuche mit  $\alpha$ -Oxyisocaprinsäure berichten. (Versuche 10 und 11 der Tabelle.)

In dem einen dieser Versuche (Versuch 10) kam das Ammoniaksalz der d-l-Leucinsäure, in dem anderen jenes der l-Leucinsäure zur Verwendung.

Wir gelangten hierbei schließlich unter Einhaltung der für die Gewinnung von Phenylalaninuraminosäure und Leucinuraminosäure oben geschilderten Methodik zu einer Substanz, deren Kristallform und Löslichkeitsverhältnisse sehr an Leucinuraminosäure erinnerte, deren Menge aber zu einer strengen Identifizierung nicht ausreichte<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 2980, 1908.

<sup>2)</sup> Es sei erwähnt, daß Embden bereits gelegentlich einer früher von Fritz Sachs (l. c.) veröffentlichten Arbeit versuchte, nach Durchströmung der Leber mit leucinsaurem Ammoniak in dem Durchblutungsblut Leucin mittels der Uraminosäuremethode nachzuweisen, doch gelang es damals nicht, diesen Nachweis zu führen.

Es sei noch erwähnt, daß wir auch einen Versuch mit glyoxylsaurem Ammoniak vornahmen in der Hoffnung, nach der Durchblutung mit dieser Substanz größere Mengen Glykokoll im Durchblutungsblute zu finden.

Es gelang schließlich, mittels der Naphthalinsulfochloridmethode eine geringe Menge einer Substanz zu isolieren, die nach Krystallform und Schmelzpunkt sehr wohl  $\beta$ -Naphthalinsulfoglykokoll sein konnte, doch reichte die Menge zu einer Elementaranalyse nicht aus.

In Anbetracht der von A. Bingel<sup>1)</sup> festgestellten Tatsache, daß Glykokoll ein normaler Blutbestandteil ist, möchten wir unserem Befunde keine entscheidende Bedeutung beimessen, uns aber die Wiederholung der Versuche mit Glyoxylsäure vorbehalten.

Nach dem Mitgeteilten dürfen wir es für wahrscheinlich halten, daß allgemein in der Natur vorkommende  $\alpha$ -Aminosäuren im tierischen Organismus aus den Ammoniaksalzen der entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäuren synthetisch gebildet werden können.

---

<sup>1)</sup> A. Bingel, Über die Gewinnung von Glykokoll aus normalem Blut. Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 382, 1908.

# Über synthetische Aminosäurebildung in der Leber.

## III. Mitteilung.

### Die Bildung körperfremder Aminosäuren.

Von

Kura Kondo.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1911.)

In der voranstehenden Arbeit von Embden und Schmitz konnte gezeigt werden, daß bei der Durchblutung der Leber unter Zusatz der Ammoniaksalze verschiedener  $\alpha$ -Ketosäuren zum Durchblutungsblute die diesen Ketosäuren entsprechenden  $\alpha$ -Aminosäuren gebildet wurden, ein Vorgang, der in geringerem Ausmaß sich auch bei der Durchströmung mit  $\alpha$ -Oxysäuren (wohl unter intermediärer Bildung von  $\alpha$ -Ketosäuren) abzuspielden scheint.

In den genannten Versuchen konnte die synthetische Bildung von l-Tyrosin, d-Alanin, optisch aktivem Leucin und optisch aktivem Phenylalanin dargetan werden.

Diese vier Aminosäuren kommen im tierischen Eiweiß vor, und von vornherein war die Möglichkeit nicht völlig ausgeschlossen, daß solche natürliche Aminosäuren während der künstlichen Durchströmung der Leber durch fermentativen Eiweißabbau entstehen könnten.

Die Tatsache aber, daß nach der Durchströmung mit einer bestimmten  $\alpha$ -Ketosäure immer nur die dieser bestimmten  $\alpha$ -Ketosäure entsprechende  $\alpha$ -Aminosäure und keine andere isoliert werden konnte, trotzdem die Isolierungsmethoden für verschiedene Aminosäuren völlig identisch waren, bewies mit Sicherheit, daß die isolierten Aminosäuren nicht durch Spaltung von Eiweiß-

substanzen, sondern synthetisch aus den zugefügten Ketosäuren entstanden war.

Dennoch erschien es nicht unnötig, nunmehr auch die Synthese solcher Aminosäuren in der Leber zu versuchen, die, soviel man weiß, nicht im tierischen Eiweiß vorkommen und deren Bildung aus Eiweißkörpern daher von vornherein völlig ausgeschlossen ist.

Wenn die Leber nicht nur natürliche, sondern auch nicht in der Natur vorkommende Aminosäuren aus den entsprechenden Ketosäuren zu bilden vermag, so sind wir sicher berechtigt, diesem Organ ganz allgemein die Fähigkeit zuzuschreiben, aus  $\alpha$ -Ketosäuren  $\alpha$ -Aminosäuren zu bilden<sup>1)</sup>.

Es ist mir nun in der Tat gelungen, die Bildung zweier, bisher nicht im Eiweißmolekül nachgewiesener Aminosäuren, der  $\alpha$ -Amino-n-buttersäure und der  $\alpha$ -Amino-n-capronsäure, in der künstlich durchströmten Leber zu erweisen.

Die Darstellung der entsprechenden Ketosäuren gestaltete sich folgendermaßen:

1. Die  $\alpha$ -Ketobuttersäure (Propionylameisensäure) wurde durch Kochen von Methyloxalessigester mit 10%iger Schwefelsäure erhalten. Sie siedete unter einem Druck von 15 mm bei 68 bis 75°.

2. Die  $\alpha$ -Keto-n-capronsäure wurde in folgender Weise dargestellt:

4,6 g Natrium werden in 100 ccm Alkohol gelöst und zu der Lösung 37,2 g n-Butylacetessigester gegeben.

Man leitet dann einen lebhaften Strom von trockenem Äthylnitridampf ein, solange noch Wärme frei wird. Die Temperatur des Gemisches wird zwischen 30 und 40° gehalten.

Nachdem die Flüssigkeit noch  $\frac{1}{2}$  Stunde gestanden hat, wird der Alkohol im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und ausgeäthert. Die ätherische Lösung wird mit Natriumsulfat getrocknet und nach dem Verjagen des Äthers im Vakuum fraktioniert. Siede-

<sup>1)</sup> Ein Fall der synthetischen Bildung einer nicht in der Natur vorkommenden  $\alpha$ -Aminosäure nach Verfütterung der entsprechenden Ketosäure ist übrigens bereits von Knoop beigebracht worden, der nach Verfütterung von  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -phenylbuttersäure an Hunde das Acetylderivat der  $\alpha$ -Amino- $\gamma$ -phenylbuttersäure erhielt.



punkt des  $\alpha$ -Oximinocapronesters bei 12 mm Druck 151 bis 152°. Schmelzpunkt 57°. Ausbeute 29 g.

Drei Portionen des Esters à 19 g wurden in je 40 ccm 85%iger Ameisensäure gelöst und nach der Vorschrift von Bouveault und Locquin<sup>1)</sup> mit 20 g Nitrosylschwefelsäure behandelt.

Die ganze Menge wurde dann vereinigt, in 600 ccm Eiswasser gegossen, die ätherische Schicht abgegossen und zweimal mit Wasser gewaschen.

Es wird dann, ohne zu trocknen, aus einem Rundkolben der Äther abdestilliert und dann im Vakuum bei 50° des Wasserbades die Ameisensäure entfernt. Der Kolbeninhalt wird in 150 ccm Äther aufgenommen und mit so viel Sodalösung ausgeschüttelt, daß die wässrige Schicht alkalisch reagiert.

Die ätherische Schicht, die die neutralen Zersetzungsprodukte des Oximinocapronesters enthält, wird nach dem Trocknen über schwefelsaurem Natrium und Abdestillieren des Äthers im Vakuum fraktioniert. Dabei geht der  $\alpha$ -Ketocapronester (20 g) bei 88 bis 89° über, während oberhalb 120° fast reines Oxim abdestilliert (12,5 g). Das Semikarbazon des Esters krystallisiert aus Methylalkohol in glänzenden Prismen vom Schmelzpunkt 149°.

Der Ester wurde in 400 ccm 4%iger Kalilauge gelöst und 24 Stunden stehen gelassen, nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure die  $\alpha$ -Ketocapronsäure mit Äther extrahiert und zusammen mit den sauren Spaltungsprodukten des Oximinocapronesters weiterverarbeitet.

Die beim Ausschütteln mit Soda erhaltene wässrig-alkalische Lösung wurde angesäuert und ausgeäthert. Der Äther wurde zusammen mit der ätherischen Lösung der durch Verseifen des Esters gewonnenen Säure über Natriumsulfat getrocknet, abdestilliert und die zurückbleibende Säure im Vakuum fraktioniert.

Sie kochte unter 14 mm Druck bei 93°. Ausbeute 18 g.

Die Durchblutungsversuche wurden genau in der gleichen Weise wie in der voranstehenden Arbeit von Embden und

---

<sup>1)</sup> Bouveault und Locquin, Darstellung der  $\alpha$ -Ketonsäureester und  $\alpha$ -Ketonsäuren aus den  $\alpha$ -Oximinoestern. Bull. de la Société chim. (3) 31, 1142, 1904.

Schmitz ausgeführt. Die Einzelheiten der vier von mir unternommenen Versuche sind aus der untenstehenden Tabelle ersichtlich.

1 Nr.	2 Der Durchströmungs- flüssigkeit zugefügte Substanz	3 Durchströmungs- flüssigkeit	4 Gewicht der Leber vor der Durch- blutung g	5 Dauer der Durch- blutung in Minuten
1	8 g $\alpha$ -Ketobuttersäure mit Ammoniak neutralisiert	1000 ccm Hundeblut 300 ccm Kochsalz- lösung von 0,85%	200	90
2	6 g $\alpha$ -Ketobuttersäure mit Ammoniak neutralisiert	1000 ccm Hundeblut 300 ccm Kochsalz- lösung von 0,85%	170	90
3	5,0 g $\alpha$ -Ketonormal- capronsäure mit Ammoniak neutralisiert	1060 ccm Hundeblut 300 ccm Kochsalz- lösung von 0,85%	240	90
4	5,0 g $\alpha$ -Ketonormal- capronsäure mit Ammoniak neutralisiert	950 ccm Hundeblut 300 ccm Kochsalz- lösung von 0,85%	115	90

Auch bezüglich der chemischen Verarbeitung des Blutes und der Leber nach der Durchblutung kann ich mich ganz auf die vorangehende Arbeit beziehen.

Ich suchte etwa gebildete  $\alpha$ -Amino-n-buttersäure als Naphthalinsulfoverbindung nachzuweisen und ging dabei auf genau dem gleichen Wege vor, der von Embden und Schmitz zur Gewinnung von  $\beta$ -Naphthalinsulfoalanin eingeschlagen wurde.

Ich erhielt auf diese Weise eine schön krystallisierende Substanz, die aus heißem Wasser, in dem sie sich leicht löste, umkrystallisiert wurde. Die Krystalle glitzerten sehr stark und hatten die Form von flachen, teils plattenartigen Blättchen. Die alkoholische Lösung der Substanz drehte die Ebene des polarisierten Lichtes nach links.

Die Menge der noch nicht völlig reinen Substanz betrug in dem ersten meiner Versuche fast 0,5 g. Nach einmaligem Umkrystallisieren schmolz die Substanz bei 120° (unkorr.), nachdem sie bei 90° zu sintern begonnen hatte.

Nach nochmaligem Umkrystallisieren erfolgte das Schmelzen bei 103°.

Mit der bei 85° zur Konstanz getrockneten Substanz wurde eine Elementaranalyse vorgenommen: 0,1310 g Substanz lieferten 0,2764 g CO<sub>2</sub> und 0,0606 g H<sub>2</sub>O.

	C	H
Gefunden:	57,54%	5,14%
Berechnet für C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> NSO <sub>4</sub> :	57,34%	5,12%

Der Gehalt der Substanz an Kohlenstoff und Wasserstoff stimmt also mit dem der  $\beta$ -Naphthalinsulfo- $\alpha$ -aminobuttersäure überein.

Aus der beobachteten Linksdrehung geht hervor, daß auch hier, wo es sich um eine anscheinend nicht in der Natur vorkommende Aminosäure handelte, eine optisch aktive Form gebildet war.

Ich habe mich noch besonders davon überzeugt, daß die racemische  $\beta$ -Naphthalinsulfo- $\alpha$ -aminobuttersäure einen von dem meiner Substanz abweichenden Schmelzpunkt hat.

Die aus d-l- $\alpha$ -Amino-n-buttersäure und  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid hergestellte Substanz begann bei 145° zu sintern und schmolz bei 148°.

Die Wiederholung des Durchblutungsversuchs mit der  $\alpha$ -Keto-n-buttersäure führte zu einem ganz ähnlichen Ergebnis wie der erste Versuch.

Es sei noch erwähnt, daß der saure Ätherextrakt aus den eingengten Blut- und Leberfiltraten deutlich nach links drehte. Möglicherweise enthielt sie neben der nur in äußerst geringer Menge nachweisbaren  $\alpha$ -Ketosäure l- $\alpha$ -Oxybuttersäure, deren Auftreten bei der Durchblutung mit  $\alpha$ -Ketobuttersäure nach Analogie der namentlich von Neubauer und seinen Mitarbeitern gewonnenen Ergebnisse von vornherein sehr wahrscheinlich ist.

Die Versuche mit  $\alpha$ -Keto-n-capronsäure führten zu ebenso eindeutigen Resultaten, wie die eben geschilderten.

Die bei der Durchströmung gebildete  $\alpha$ -Amino-n-capronsäure wurde in genau derselben Weise wie in der voranstehenden Arbeit das Phenylalanin und das Leucin in die Uraminosäure übergeführt.

Auch hier gelang es leicht, die gebildete Uraminosäure mit Äther zu extrahieren.

Ihre Menge betrug im ersten Versuch annähernd 0,36 g.

Nach einmaligem Umkrystallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle war sie völlig farblos.

Im Capillarröhrchen erhitzt zeigte sie bei 166° leichte Veränderung, sinterte bei 172° deutlich und schmolz unter Gasentwicklung bei 176°. Weiteres Umkrystallisieren änderte den Schmelzpunkt nicht mehr.

Die Substanz krystallisierte in schönen Prismen.

Die Elementaranalyse der Substanz hatte folgendes Ergebnis: 0,1208 g der bei 110° getrockneten Substanz gaben 0,2134 g CO<sub>2</sub> und 0,0868 g H<sub>2</sub>O.

	C	H
Gefunden:	48,17%	7,98%
Berechnet für C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :	48,27%	8,05%

Der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt stimmt also mit dem der Uramino-n-capronsäure überein.

Daß es sich hier nicht etwa um die Uraminosäure des gewöhnlichen Leucins handelt, geht ohne weiteres aus dem Schmelzpunkte hervor, der für die Hydantoinensäure des l-Leucins etwa 203°, für die von mir isolierte Uraminosäure 176° beträgt.

Ich konnte mich ferner leicht überzeugen, daß auch in diesem Falle nicht die d-l-Aminosäure, sondern eine optisch aktive Form bei der Durchströmung der Leber gebildet war.

Der Schmelzpunkt der d-l-Uramino-n-capronsäure, die durch Kochen von d-l-Amino-n-capronsäure mit Harnstoff dargestellt wurde, lag nämlich bei 165° (Beginn des Sinterns bei 160°), also wesentlich niedriger als jener der von mir isolierten Substanz.

Auch dieser Versuch wurde wiederholt.

Die Menge der isolierten Uraminosäure war in diesem Falle etwas größer als beim ersten Versuch.

Sie betrug noch nach dem ersten Umkrystallisieren mit Tierkohle 0,336 g.

Ihr Verhalten beim Erhitzen im Capillarröhrchen stimmte mit dem der aus dem vorangehenden Versuch isolierten Substanz überein. (Schmelzen unter Gasentwicklung bei 175°.)

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist also, daß bei künstlicher Durchblutung der Leber des Hundes unter Zusatz von  $\alpha$ -Ketobuttersäure  $\alpha$ -Amino-n-buttersäure gebildet wird, bei

der künstlichen Durchströmung mit  $\alpha$ -Keto-n-capronsäure  $\alpha$ -Amino-n-capronsäure.

Beide Substanzen treten in optisch aktiver Form auf.

Im Zusammenhalt mit den in der dieser vorangehenden Mitteilung von Embden und Schmitz beschriebenen Versuchen darf angenommen werden, daß der Leber des Hundes ganz allgemein die Fähigkeit zukommt, aus  $\alpha$ -Ketosäuren und Ammoniak optisch aktive Aminosäuren zu bilden.

Aus den Versuchen von Embden und Schmitz geht hervor, daß bei der Aminosäuresynthese aus Ketosäure und Ammoniak von den beiden hier möglichen optisch aktiven Aminosäuren die in der Natur vorkommende Modifikation gebildet wird.

Die in meinen Versuchen synthetisch gebildeten, optisch aktiven Aminosäuren kommen in der Natur nicht vor.

Es darf aber von vornherein als wahrscheinlich gelten, daß sie, man möchte sagen die natürlichere, d. h. die für den Organismus leichter angreifbare Form darstellen.

Die im Tierkörper synthetisch gebildeten Aminosäuren werden danach voraussichtlich allgemein die Antipoden der bei der Spaltung racemischer Aminosäuren durch tierische Organismen zurückbleibenden optischen Komponenten sein.

---

# Über synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber.

## IV. Mitteilung.

### Bildung von Alanin aus Glykogen.

Von

Hanni Fellner.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1911.)

In den voranstehenden Arbeiten wurde gezeigt, daß  $\alpha$ -Ketosäuren bei der künstlichen Durchblutung der Leber in  $\alpha$ -Aminosäuren übergehen können. Ein gleiches Verhalten zeigte auch das Ammoniaksalz einer  $\alpha$ -Oxysäure — der Leucinsäure — wenn auch in weit geringerem Grade als das Ammoniaksalz der ihr entsprechenden Ketosäure.

Es erscheint sehr wahrscheinlich, daß die Leucinsäure vor ihrer Umwandlung in Leucin zu der entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäure oxydiert wurde.

Vor der Ausführung der eben erwähnten Versuche hatte Knoop gezeigt, daß  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -phenylbuttersäure bei der Verfütterung an den Hund zum Teil in das Acetylderivat der  $\alpha$ -Amino- $\gamma$ -phenylbuttersäure übergeht.

Umgekehrt geht aus Untersuchungen von O. Neubauer und seinen Mitarbeitern hervor, daß der Abbau der Aminosäuren im Tierkörper offenbar über die entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäuren erfolgt.

Danach erscheint es höchst wahrscheinlich, daß beim Abbau von  $\alpha$ -Aminosäuren entstandene  $\alpha$ -Ketosäuren — und indirekt auch  $\alpha$ -Oxysäuren — im Tierkörper in  $\alpha$ -Aminosäuren zurückverwandelt werden können.

Nun entstehen aber  $\alpha$ -Oxysäuren (und vielleicht auch  $\alpha$ -Ketosäuren) im Organismus nicht nur aus Aminosäuren, sondern

eine bestimmte  $\alpha$ -Oxysäure, nämlich die Fleischmilchsäure, wird auch, wie aus früheren Versuchen von Embden und seinen Mitarbeitern hervorgeht, aus Kohlenhydraten, insbesondere aus Glykogen und Traubenzucker gebildet. Wie aus noch unveröffentlichten Versuchen von S. Oppenheimer hervorgeht, sind auch Lävulose und Glycerin als Muttersubstanzen der Milchsäure zu betrachten.

Schon vor längerer Zeit hat Embden in unveröffentlichten Versuchen nach der künstlichen Durchströmung der Leber unter Zusatz von milchsaurem Ammoniak auf synthetisch gebildetes Alanin gefahndet. Diese Versuche führten nicht zu einem positiven Ergebnis, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, daß die damals angewandte chemische Methodik eine sehr unvollkommene war.

Ich habe nun nach Veröffentlichung der Knoopschen Arbeit und im Anschluß an die in einer voranstehenden Arbeit von Embden und Schmitz ausgeführten Untersuchungen festzustellen versucht, ob bei der künstlichen Durchströmung der abnorm glykogenhaltigen Leber, wobei eine reichliche Bildung von Milchsäure beobachtet wird<sup>1)</sup>, Alanin, die der Milchsäure entsprechende Aminosäure, entsteht. Es sei gleich hier erwähnt, daß es in der Tat gelang, das Auftreten von Alanin bei der künstlichen Durchströmung der abnorm glykogenreichen Leber nachzuweisen, während dieser Nachweis bei entsprechenden Versuchen an der glykogenarmen oder glykogenfreien Leber nicht möglich war<sup>2)</sup>.

Bezüglich der Methodik kann ich mich ganz kurz fassen.

Sämtliche Versuche wurden ausschließlich an Hunden ausgeführt. Der abnorme Glykogenreichtum der Leber wurde dadurch erreicht, daß die Tiere zunächst neben einer gemischten Kost, während der letzten 24 Stunden ohne weitere Nahrung, reichliche Mengen von Rohrzucker, in möglichst wenig Wasser gelöst, mit der Schlundsonde erhielten. Die letzten Rohrzuckereingießungen erfolgten 3 bis 5 Stunden vor dem Versuch. Falls die Hunde im Anschluß an die Rohrzuckerverabreichung nicht

---

<sup>1)</sup> Embden und Kraus, Verhdl. d. Kongr. f. inn. Med., Wiesbaden 1909.

<sup>2)</sup> Dieses Ergebnis meiner Versuche wurde bereits in der ersten Mitteilung von Embden und Schmitz über synthetische Aminosäurebildung in der Leber kurz mitgeteilt.

brachen — war dies der Fall, so wurden sie aus dem Versuch genommen —, wurde auf diese Weise stets ein sehr hoher Glykogengehalt der Leber erzielt (bis zu 20%, des feuchten Lebergewichts).

Eine für die Zwecke der vorliegenden Untersuchung ausreichende Glykogenarmut konnte einfach durch mehrtägige Karenz erzielt werden. In mehreren Fällen arbeitete ich auch an der glykogenfreien Leber. Die Befreiung von Glykogen geschah in der früher von Embden<sup>1)</sup> angegebenen Weise. Zur Durchblutung wurde, von einigen anfänglichen Versuchen abgesehen, ausschließlich Hundeblut verwendet. Dem Durchblutungsblut wurden in nahezu allen Versuchen 2 g Ammoniumchlorid in annähernd isotonischer (1%, iger) Lösung hinzugefügt, um so das Vorhandensein einer reichlichen Ammoniakmenge zu gewährleisten. Die Durchblutungsdauer betrug 90 Minuten, mit wenigen Ausnahmen, in denen sie etwas geringer war.

Bezüglich aller weiteren technischen Einzelheiten der Durchblutungsversuche, die sämtlich, ebenso wie die der voranstehenden Arbeiten, mit dem Mandelschen Apparat ausgeführt wurden, kann ich auf frühere Arbeiten aus dem hiesigen Institut verweisen.

Blut und Leber wurden nach Beendigung des Versuchs in der von Schenck angegebenen Weise mit Salzsäure und Sublimat gefällt. Die am nächsten Morgen abgesaugte Flüssigkeit wurde mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert, durch einen Luftstrom von Schwefelwasserstoff befreit und nach der Abtrennung des Sulfidniederschlags mit Natronlauge neutralisiert. Die so aus dem Blute und aus der Leber gewonnenen Extrakte wurden vereinigt, mit Natronlauge neutralisiert und in einem Verdunstkasten nach Faust bei einer 37° nicht übersteigenden Temperatur der Flüssigkeit auf etwa  $\frac{1}{10}$  ihres Volumens eingengt<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> G. Embden, Über Zuckerbildung bei künstlicher Durchblutung der glykogenfreien Leber. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 46, 1905.

<sup>2)</sup> Aus dem Extrakt abnorm glykogenreicher Lebern fällt beim Einleiten von Schwefelwasserstoff das Quecksilbersulfid nicht aus, sondern wird augenscheinlich durch das Glykogen in kolloidaler Lösung gehalten. Durch Versetzen der durch einen Luftstrom von Schwefelwasserstoff befreiten Flüssigkeiten mit dem gleichen Volumen Alkohol werden Glykogen und Sulfid ausgefällt.



Nunmehr wurde die Flüssigkeit mit so viel starker Natronlauge versetzt, daß rotes Lackmuspapier intensiv blau gefärbt wurde, vom entstandenen Phosphatniederschlag abfiltriert und die so gewonnene klare Flüssigkeit etwa 2 Stunden im Vakuum bei einer 35° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers zur Vertreibung des Ammoniaks destilliert. Jetzt prüfte ich die Flüssigkeit auf Ammoniakfreiheit; war noch Ammoniak vorhanden, so wurde die Vakuumdestillation, eventuell unter nochmaligem Zusatz von Natronlauge, wiederholt.

Um bei der nunmehr folgenden Schüttelung mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid einen unnötigen und vielleicht schädlichen Überschuß von Natronlauge zu vermeiden, wurde die Flüssigkeit jetzt zunächst wieder mit Salzsäure neutralisiert und dann wieder mit so viel starker Natronlauge versetzt, bis rotes Lackmuspapier intensiv blau gefärbt wurde. Die Flüssigkeit wurde alsdann, wenn nötig, auf etwa 500 bis 600 ccm aufgefüllt, mit etwa 5 g  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid in ätherischer Lösung versetzt und bei einer Temperatur von 22 bis 25° während ca. 20 Stunden in der Schüttelmaschine geschüttelt.

War die Alkalescenz während des Schüttelns schwächer geworden, so wurde etwas starke Natronlauge zugesetzt.

Nach Abtrennung der ätherischen Schicht im Scheidetrichter wurde die Flüssigkeit filtriert, mit Salzsäure stark angesäuert und die hierbei ausfallenden Reaktionsprodukte mit Äther aufgenommen. Die Schüttelung mit Äther wurde mehrmals wiederholt.

Die weitere Verarbeitung geschah ganz in derselben Weise, wie es in einer voranstehenden Arbeit von Embden und Schmitz für die Durchblutungsversuche mit Brenztraubensäure beschrieben wurde.

Während es mir in den Versuchen an der glykogenarmen Leber und an der glykogenfreien Leber nicht möglich war, aus dem Gemenge der von  $\beta$ -Naphthalinsulfamid befreiten Naphthalinsulfone eine bestimmte Verbindung zu isolieren, gelang es in den Versuchen an der abnorm glykogenhaltigen Leber ohne weiteres, eine schön krystallisierte Verbindung darzustellen, die ganz die Eigenschaften des  $\beta$ -Naphthalinsulfo-d-alanins, wie sie in der vorigen Arbeit geschildert wurden, aufwies.

Die krystallwasserhaltige Substanz schmolz unscharf schon unterhalb  $60^{\circ}$ . Zur Analyse wurde sie im Schiffchen bei  $100^{\circ}$  getrocknet, wobei die zunächst entstandene Flüssigkeit nach dem Entweichen des Wassers wieder krystallisierte.

Die Elementaranalyse wurde in mehreren Fällen vorgenommen und gab mit denen des  $\beta$ -Naphthalinsulfoalanins gut übereinstimmende Werte.

In einem Versuche (Versuch 3) wurden zur Elementaranalyse 0,1242 g bei etwa  $100^{\circ}$  zur Gewichtskonstanz getrockneter Substanz verwendet.

0,1242 g Substanz gaben 0,2550 g  $\text{CO}_2$  und 0,0540 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

	C	H
Gefunden:	55,99%	4,83%
Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{SN}$ :	55,91%	4,66%

Die Ausbeute an reinem Naphthalinsulfoalanin war eine wesentlich geringere als in den Versuchen mit Brenztraubensäure, doch ging offenbar eine große, vielleicht die Hauptmenge, bei dem notwendigen Umkrystallisieren verloren. Die Menge der gewonnenen reinen Substanz betrug in dem obenerwähnten Versuch 3: 0,20 g.

In Versuch 7 wurden 0,1372 g der wasserhaltigen Substanz zur Analyse verwendet. Diese verloren bei  $100^{\circ}$  0,0158 g Wasser = 11,51%. (Berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{SN} + 2\text{H}_2\text{O}$  11,43%.)

Bei der Elementaranalyse lieferten 0,1214 g Substanz 0,2474 g  $\text{CO}_2$  und 0,0518 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

	C	H
Gefunden:	55,57%	4,74%
Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{SN}$ :	55,91%	4,66%

Wie in den Versuchen mit Brenztraubensäure drehte auch das in meinen Versuchen isolierte  $\beta$ -Naphthalinsulfoalanin in alkoholischer Lösung nach links. Es handelte sich also auch hier um das Auftreten des natürlichen d-Alanins bei der Durchblutung der Leber.

In mehreren Fällen machte die Isolierung des  $\beta$ -Naphthalinsulfo-d-alanin unüberwindliche Schwierigkeiten, weil daneben in sehr großer Menge eine andere Substanz auftrat. Diese Substanz hatte sehr ähnliche Löslichkeitsverhältnisse wie das  $\beta$ -Naphthalinsulfoalanin. Sie erwies sich als stickstofffrei und

konnte durch Schmelzpunkt und Elementaranalyse als  $\beta$ -Naphthalinsulfinsäure identifiziert werden. Offenbar war also in den mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid geschüttelten Flüssigkeiten eine reduzierende Substanz vorhanden, die die Umwandlung von  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid zur  $\beta$ -Naphthalinsulfinsäure bewirkte.

In besonderen Versuchen, in denen ich ätherische  $\beta$ -Naphthalinsulfochloridlösungen mit alkalischen Traubenzuckerlösungen verschiedener Konzentration schütteln ließ, überzeugte ich mich, daß durch Traubenzucker keinerlei Bildung von Sulfinsäure erfolgte. Wodurch die Reduktion zur Sulfinsäure erfolgte, bleibt also noch unklar. Ich möchte aber hervorheben, daß in den Versuchen an der glykogenarmen Leber keinerlei Sulfinsäurebildung beobachtet wurde.

Ich habe bereits oben erwähnt, daß es im Gegensatz zu den Durchblutungsversuchen an der stark glykogenhaltigen Leber in den an der glykogenarmen oder glykogenfreien vorgenommenen nicht gelang, das Auftreten von d-Alanin bei der Durchblutung nachzuweisen.

Es war von vornherein nicht völlig ausgeschlossen, daß trotzdem auch in diesen Versuchen Alanin in wesentlicher Menge gebildet worden war, sich aber aus irgendwelchen Gründen weniger leicht als in den Versuchen an der glykogenreichen Leber aus dem Gemenge der  $\beta$ -Naphthalinsulfone isolieren ließ.

Ich will daher ganz kurz auf einige weitere von mir unternommene Versuche hinweisen, in denen ich einfach die Ausbeute an  $\beta$ -Naphthalinsulfoprodukten nach vollständiger Entfernung des  $\beta$ -Naphthalinsulfamids bestimmte. Ich ging dabei in der Art vor, daß ich mit den jeweils erhaltenen  $\beta$ -Naphthalinsulfonen eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl vornahm. Ich will auf die Einzelheiten dieser Versuche nicht eingehen, sondern nur bemerken, daß die Menge des in Form von  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindungen gewinnbaren Stickstoffs in den Versuchen an der stark glykogenhaltigen Leber weitaus größer war als in den an der glykogenarmen, woraus hervorgeht, daß bei der Durchströmung der glykogenhaltigen Leber in der Tat mehr Aminosäure gebildet wird als bei der des glykogenarmen Organs.

Es sei noch erwähnt, daß in einem Versuche an der glykogenarmen Leber, indem ich dem Durchblutungsblute milchsaures

Ammoniak hinzufügte, der Nachweis der Alaninbildung geführt werden konnte. Es ist sehr wahrscheinlich, daß sowohl in diesem Versuche, als auch in jenem an der stark glykogenhaltigen Leber als intermediäres Produkt bei der Amidierung Brenztraubensäure auftrat.

Wie dem aber auch sei, jedenfalls geht aus meinen Versuchen hervor, daß bei der künstlichen Durchströmung der Leber aus Glykogen d-Alanin entstehen kann.

Hiermit ist zum ersten Male der exakte Nachweis geführt worden, daß Kohlenhydrat im intermediären Stoffwechsel des Säugetieres unter Aufnahme von Stickstoff in eine Aminosäure, d. h. in einen charakteristischen Bestandteil des Eiweißmoleküls, übergehen kann.

---

# Über das Verhalten der d- $\alpha$ -Glucoheptonsäure im Organismus des Kaninchens, Hundes und Menschen.

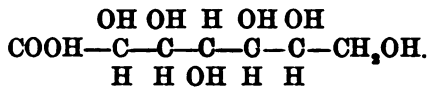
Von

Kohshi Ohta (Tokio).

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1911.)

Über das Schicksal der höheren aliphatischen Oxy Säuren im Tierkörper ist äußerst wenig bekannt. Eine leicht zugängliche Substanz aus dieser Reihe ist die  $\alpha$ -Glucoheptonsäure:



Sie verdient noch besondere Beachtung, da sie in Form ihres süßschmeckenden Anhydrids, des  $\alpha$ -Glucoheptonsäurelactons, von G. Rosenfeld<sup>1)</sup> auf Grund interessanter Versuche zum Genuß für Diabetiker empfohlen worden ist.

Über das Verhalten des Glucoheptonsäurelactons bei Zuckerkranken liegen noch Beobachtungen von J. Pringsheim<sup>2)</sup> und Fr. Rosenfeld<sup>3)</sup> vor. Die Autoren geben in Übereinstimmung mit Fr. Rosenfeld an, daß die Substanz bis zu 50 g u. mehr von Zuckerkranken verbrannt werden und in bisher unerklärter Weise zuckerherabsetzend wirken kann.

Ob Umwandlungsprodukte des Glucoheptonsäurelactons zur Ausscheidung gelangen können und wie sich die Substanz beim normalen Tier und Menschen verhält, ist bislang nicht systematisch untersucht.

Deshalb prüfte ich, ob vielleicht reduzierende Substanzen (etwa Glucoheptose) oder saure Oxydationsprodukte (etwa Pentaoxy-

<sup>1)</sup> G. Rosenfeld, Berl. klin. Wochenschr. 1911, Nr. 29.

<sup>2)</sup> J. Pringsheim, Therap. Monatshefte 1911, 657.

<sup>3)</sup> Fr. Rosenfeld, Deutsche med. Wochenschr. 1911, Nr. 47.

pimelinsäure) aus dem Glucoheptonsäurelacton im Tierkörper entstehen, wie viel von dem Lacton zur Resorption gelangt und in welcher Form die unveränderte Glucoheptonsäure wieder zur Ausscheidung kommt.

Es hat sich kein Anhaltspunkt dafür ergeben, daß neue Umwandlungsprodukte aus dem Glucoheptonsäurelacton entstehen. Bezüglich der Resorption fand ich, daß sowohl beim Kaninchen wie beim Hunde in den Faeces Glucoheptonsäurelacton in wechselnder Menge auftritt.

Einen nicht unwesentlichen Gesichtspunkt für die Beurteilung der Ausscheidung von unverbrannter Glucoheptonsäure hat die genaue Untersuchung der betreffenden Tier- und Menschenharn ergeben.

Die bisherigen Angaben über die Menge des wieder ausgeschiedenen Glucoheptonsäurelactons stützen sich mangels anderer charakteristischer Eigenschaften auf das polarimetrische Verhalten der nativen Urine.

Da Glucoheptonsäurelacton eine beträchtliche Linksdrehung<sup>1)</sup> ( $[\alpha]_D = -52,2^\circ$  bis  $-52,6^\circ$ ) aufweist, so wäre unverändertes Lacton leicht im Harn zu entdecken.

Nicht genug beachtet ist aber bisher, daß verabfolgtes Glucoheptonsäurelacton nicht als solches, sondern in Form seiner Alkalisalze ausgeschieden wird. Die spezifische Drehung der letzteren ist nur sehr gering; so beträgt<sup>1)</sup> z. B. für das Natriumsalz<sup>2)</sup>  $[\alpha]_D = +7,2^\circ$ .

Die unerwartete Umkehrung der Drehungsrichtung und der geringe absolute Betrag der Rotation haben bisher wohl zu einer falschen Beurteilung der wirklich ausgeschiedenen Quantitäten geführt.

Denn beispielsweise dreht der Harn bei einem Gehalt von 1% glucoheptonsaurem Natrium nur entsprechend 0,13% Traubenzucker nach rechts. Eine solche geringe Rechtsdrehung kann um so eher übersehen werden, als die bisweilen vorhandene natürliche schwache Linksdrehung mancher Urine sowie

<sup>1)</sup> Alb. van Ekenstein, W. P. Jorissen u. L. Th. Reicher, Zeitschr. f. physikal. Chem. 21, 383, 1897.

<sup>2)</sup> G. Rosenfeld (l. c.) erwähnt zwar, daß bei seinem Hundeversuch ein Teil des verabfolgten Lactons als Alkalisalz im Harn erschien, doch findet sich bei ihm kein Hinweis auf die dabei eintretende Drehungsänderung und deren Bedeutung für die quantitativen Verhältnisse.

die Linksdrehung vergorener (diabetischer) Harn<sup>1)</sup> im selben Sinne wirken, ein geringes dextrogyres Rotationsvermögen zu verdecken.

Auf recht einfache Weise gelingt es nun, die richtigen Zahlen für die vorhandene Glucoheptonsäuremenge festzustellen. Denn kocht man den Harn mit Salzsäure und läßt 24 Stunden stehen, so erhält man jetzt die Drehung des Glucoheptonsäurelactons. Es beruht dieses auf der schon Kiliari und E. Fischer bekannten Unbeständigkeit der freien (durch HCl aus ihren Salzen frei gemachten) Glucoheptonsäure und ihrem leichten Übergang in ihr Anhydrid, das Lacton<sup>2)</sup>.

Dieses Verhalten geht klar aus folgenden Versuchen hervor:

a) 2,0 g Glucoheptonsäurelacton wurden in 50,0 ccm Wasser gelöst.

10,0 ccm dieser Lösung wurden mit

2,0 „ verd. HCl

gemischt und sofort polarisiert.

Die Drehung war im 2 dm-Rohr entsprechend  $-3,3\%$  Glucose.

b) 10,0 ccm derselben Lösung wurden mit

2,0 „ verd. NaOH

versetzt. Die alkalisch reagierende Lösung drehte sofort im 2 dm-Rohr  $= +0,2\%$  Glucose.

c) Die Mischung von

10,0 ccm derselben Lösung und

7,0 „ HCl

zeigte im 2 dm-Rohr nach 4 Stunden die Drehung entsprechend  $-2,3\%$  Glucose.

d) Fügt man zu

10,0 ccm derselben Glucoheptonsäurelösung

2,0 „ NaOH und dann

5,0 „ HCl,

---

<sup>1)</sup> C. Neuberg, diese Zeitschr. 24, 530, 1910; ferner C. Neuberg, *Der Harn*. Handbuch, Berlin 1911, S. 352.

<sup>2)</sup> Durch besondere Versuche habe ich festgestellt, daß der normale Harn bei meinen Hunden durch Kochen mit Salzsäure nicht etwa lävogyrt wird. Im Gegenteil verschwindet eine etwa vorhandene Linksdrehung durch die Behandlung mit Salzsäure wohl infolge Zerfalls der gepaarten Glucuronsäuren. Die dabei ev. auftretende Rechtsdrehung ist so minimal, daß sie nicht in Betracht kommt; keinesfalls wird aber dadurch die Menge des lävogyren Glucoheptonsäurelactons zu groß befunden.

so besitzt die deutlich sauer reagierende Lösung nach 4 Stunden eine Rotation entsprechend  $-1,7\%$  Glucose.

Nach 24 Stunden weisen c) und d) eine völlig gleiche Drehung auf, und zwar entsprechend  $-2,4\%$ .

Die Enddrehung wurde beim Kochen schneller erreicht, doch empfiehlt sich, um ganz sicher zu gehen, 24stündiges Warten.

Bei Urinen verfährt man ganz ebenso, muß jedoch meist klären. Das kann durch vorsichtige Behandlung mit Knochenkohle geschehen, da diese aus siedender salzsaurer Lösung Substanzen der Zuckerreihe nur wenig absorbiert und sehr helle Flüssigkeiten liefert<sup>1)</sup>.

Die Bestimmung konnte ich in meinen Fällen einfach durch Polarisation ausführen, da keine anderen optisch-aktiven Substanzen zugegen waren. Die Berechnung ist außerordentlich einfach. Nach van Ekenstein, Jorissen und Reicher (l. c.) ist die spez. Drehung von  $\alpha$ -Glucoheptonsäurelacton in weiten Grenzen schwankend  $= -52,2^\circ$  bis  $-52,6^\circ$ , d. h. genau so groß, aber entgegengesetzt gerichtet wie bei d-Glucose. Ein Traubenzuckerprozentanzeigender Apparat gibt dann ohne weiteres den prozentischen Gehalt an Glucoheptonsäurelacton an.

## I. Versuche am Kaninchen.

### Kaninchen A.

Körpergewicht 2,0 kg.

a) Zum ersten Male wurden 10,0 g Glucoheptonsäurelacton<sup>2)</sup> in 20 ccm Wasser per Sohlundsonde eingegeben.

Harnmenge 55 ccm (in 24 Stunden).

12 ccm davon wurden mit 2 ccm HCl aufgeköcht und gleichzeitig etwas eingeengt, dann durch wenig Knochenkohle entfärbt. Das Filtrat, das klar und farblos war, wurde wieder bis auf 14 ccm mit Waschwasser aufgefüllt und bis zum Eintritt konstanter Enddrehung 24 Stunden stehen gelassen.

Die Drehung<sup>3)</sup> im 1 dm-Rohr war  $-1,9$ .

<sup>1)</sup> J. Bang u. G. Bohmannsson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 449, 1909.

<sup>2)</sup> Das zu diesen Versuchen benutzte Material war von den Höchster Farbwerken in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

<sup>3)</sup> Die Drehung wurde stets in einem Apparat bestimmt, der bei Verwendung eines 2 dm-Rohres Procente Traubenzucker anzeigte.



100 ccm Filtrat enthalten  $1,9 \times 2 = 3,8$  g Glucoheptonsäurelacton.  
 14 „ „ „ 0,532 g „  
 12 „ Harn, die diesen 14 ccm  
 Filtrat entsprechen, enthalten 0,532 g „  
 In der Gesamtmenge von 55 ccm  
 Harn sind . . . . . 2,438 g „

Von den verabfolgten 10 g Glucoheptonsäurelacton sind also rund 25% wieder ausgeschieden.

b) Demselben Kaninchen wurden 15,0 g Glucoheptonsäurelacton, in 30 ccm Wasser gelöst, verabfolgt.

Harnmenge in 24 Stunden 110 ccm.

Der Harn reduzierte alkalische Kupferlösung nicht.

Die Drehung wurde wie bei Versuch a bestimmt, und zwar war sie im 1 dm-Rohr =  $-0,2$  (für 14 ccm Filtrat, die 12 ccm nativem, mit Salzsäure behandeltem Harn entsprachen).

Die Gesamtmenge des ausgeschiedenen Glucoheptonsäurelactons berechnet sich daraus zu

$$\frac{0,2 \times 2 \times 14}{100} \times \frac{110}{12} = 0,513 \text{ g.}$$

Also wurden 3,42% der eingegebenen Menge nicht verwertet.

3. Demselben Tiere wurden 20,0 g Glucoheptonsäurelacton in 40 ccm Wasser beigebracht.

In 24 Stunden waren 180 ccm Harn entleert.

Die Drehung wurde nach den gemachten Angaben ermittelt und betrug im 1 dm-Rohr =  $-0,4$ .

Die ausgeschiedene Menge des Glucoheptonsäurelactons im Harn berechnet sich zu

$$\frac{0,4 \times 2 \times 14}{100} \times \frac{180}{12} = 1,68 \text{ g.}$$

In Prozenten wurden 8,4% wieder im Harn gefunden.

### Kaninchen B.

Körpergewicht 2,3 kg.

Bei diesem Versuche wurden 20,0 g Glucoheptonsäurelacton in wässriger Lösung in 2 Portionen per Schlundsonde eingegeben. Der Harn wurde an den nachfolgenden 3 Tagen gesondert gesammelt. 10 ccm von jeder Portion wurden mit 2 ccm HCl und zur Entfärbung mit einer Messerspitze Knochenkohle gekocht, eingeeengt und filtriert. Das Filtrat wurde wieder bis auf 12 ccm gebracht und nach 1 tägigem Stehen polarisiert.

Am 1. Tage betrug die Harnmenge 57 ccm.

Drehung im 1 dm-Rohr =  $-1,7$ .

Also

$$\frac{1,7 \times 2 \times 12}{100} \times \frac{57}{10} = 2,33 \text{ g}$$

Glucoheptonsäurelacton gelangten wieder zur Ausscheidung.

Am 2. Tage war die Harnmenge 90 ccm.

Drehung von 10 ccm mit HCl gekochtem und auf 12 ccm gebracht  
 Urin im 1 dm-Rohr — 0,4.

Demnach wurden

$$0,4 \times 2 \times \frac{12}{100} \times \frac{90}{10} = 0,864 \text{ g}$$

Glucuheptonsäurelacton noch am nächsten Tage ausgeschieden.

Am 3. Tage betrug die Harnmenge 100 ccm.

Drehung von 10 ccm mit HCl gekochtem und auf 12 ccm auf-  
 gefülltem Harn im 1 dm-Rohr — 0,2.

Daraus ergibt sich, daß

$$0,2 \times 2 \times \frac{12}{100} \times \frac{100}{10} = 0,48 \text{ g}$$

Glucuheptonsäurelacton noch ausgeschieden wurden<sup>1)</sup>.

In 3 Tagen wären demnach im Harn (2,326 + 0,864 + 0,480 =) 3,67 g  
 wieder aufgefunden, d. h. von den verabfolgten 20,0 g Glucuheptonsäure-  
 lacton wurden 81,6% ausgenutzt.

Jedenfalls kommen beim Kaninchen erhebliche Schwankungen  
 in der Toleranz für Glucuheptonsäurelacton vor.

#### Gewinnung von Glucuheptonsäure aus Kaninchenharn.

Es schien mir unerlässlich, die durch die Drehungs-  
 bestimmungen gewonnenen Resultate insofern zu kontrollieren,  
 als wenigstens in Stichproben die Identität der optisch-aktiven  
 Verbindung mit Glucuheptonsäure festgestellt werden mußte.  
 Das geschah durch Isolierung der letzteren in Substanz.

Der nach Verabfolgung von 20 g Glucuheptonsäurelacton ge-  
 sammelte Harn wurde mit Essigsäure neutralisiert und mit Blei-  
 essig ausgefällt. Das Filtrat wurde mit Bleiessig und Ammoniak  
 versetzt, der entstandene Niederschlag nach einigem Stehen  
 abgesaugt und mit Wasser tüchtig ausgewaschen, bis das  
 Waschwasser nicht mehr alkalisch reagierte. Der weiße Nieder-  
 schlag wurde in einem Mörser mit wenig Wasser fein an-  
 gerieben, dann in einen Kolben übergespült und mit Schwefel-  
 wasserstoffgas zerlegt, zuletzt in der Wärme. Die Flüssigkeit  
 wurde heiß abfiltriert und das klare Filtrat auf dem Wasser-  
 bade bis zum Sirup eingengt. Dann wurde absoluter Alkohol  
 hinzugefügt und auf dem Wasserbade kurze Zeit erwärmt, da-

<sup>1)</sup> Es kann zweifelhaft sein, ob diese Linksdrehung noch auf Gluco-  
 heptonsäure zu beziehen ist. Freilich kommen Kaninchenharn für sich  
 nicht vor, die keine Drehung zeigen und nach dem Kochen mit ver-  
 dünnter Salzsäure lävogyrt werden.

mit der hierbei entstandene Niederschlag sich in groben Flocken absetzte, und schließlich abfiltriert. Der Rückstand auf dem Filter wurde nochmals in wenig Wasser gelöst und wieder durch Zusatz von absolutem Alkohol gefällt, nach dem Erwärmen filtriert und mit heißem Alkohol ausgewaschen. Beide alkoholischen Filtrate wurden vereinigt und auf dem Wasserbade vorsichtig bis zum Sirup konzentriert, dann mit einem Glasstabe bis zur beginnenden Krystallisation gerührt und 1 Tag stehen gelassen.

Die ausgeschiedenen Krystalle, die nur wenig gefärbt waren, wurden mit verdünntem Alkohol gewaschen, in Wasser wieder gelöst und mit Knochenkohle entfärbt. Die nunmehr auskrystallisierte Substanz wurde auf der Nutsche mit Alkohol gewaschen und dann im Vakuum getrocknet. Ausbeute rund 2,0 g.

Die farblosen Krystalle schmelzen bei raschem Erhitzen gegen  $152^{\circ}$ . Die wässrige Lösung reduziert gar nicht Fehlingsche Mischung, dagegen alkalische Silbernitratlösung ziemlich stark; sie wird durch Bleiessig allein nicht, wohl aber nach Zusatz von  $\text{NH}_3$  gefällt.

Die spezifische Drehung der wässrigen Lösung fand ich:

$$[\alpha]_D = -53,3^{\circ}$$

$$(\alpha = -5,17^{\circ}, l = 2, c = 4,85).$$

$$0,1038 \text{ g Substanz: } 0,1530 \text{ g CO}_2, 0,0549 \text{ g H}_2\text{O}.$$

$$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_7. \text{ Ber.: C} = 40,39, \text{ H} = 5,77\%;$$

$$\text{gef.: C} = 40,18, \text{ H} = 5,88\%.$$

Der Kot des Tieres wurde nach Verabfolgung von 20 g Glucuheptonsäurelacton 3 Tage lang gesammelt; seine Menge betrug 50 g. Durch Extraktion mit Wasser und Behandlung des Auszuges mit Mercuriacetat usw. wurde nur eine minimal drehende Lösung erhalten.

## II. Versuch am Hunde.

### Hund C.

Körpergewicht 8,8 kg.

a) Das Tier erhielt 20,0 g Glucuheptonsäurelacton, gelöst in 30 cm Wasser, per Schlundsonde. Harn und Kot wurden in nachfolgenden 3 Tagen gesondert gesammelt.

100 ccm Harn der ersten 24 Stunden wurden auf dem Wasserbade bis auf 20 ccm eingeengt, dann 2 ccm HCl zugefügt und gekocht, gleichzeitig mit einer Messerspitze Knochenkohle entfärbt. Die dabei konzentrierte Lösung wurde filtriert und das mit Waschwasser wieder bis auf 12 ccm aufgefüllte Filtrat darauf polarisiert.

Am 1. Tage betrug die Harnmenge 1180 ccm.

Die auf 12 ccm eingeengten 100 ccm Urin zeigten im 1 dm-Rohr die Drehung — 2,4.

Daraus berechnet sich, daß

$$2,4 \times 2 \times \frac{12}{100} = 0,576 \text{ g}$$

Glucuheptonsäurelacton in 100 ccm Harn enthalten waren, oder in der Tagesmenge von 1180 ccm

$$0,576 \times \frac{1180}{100} = 6,797 \text{ g.}$$

6,797 g Glucuheptonsäurelacton wurden also schon am 1. Tage ausgeschieden, entsprechend rund 34% der verabfolgten Menge.

Am 2. Tage belief sich die Harnmenge auf 1530 ccm.

100 ccm Urin wurden eingeengt und nach Behandlung mit Salzsäure und Knochenkohle auf 24 ccm gebracht.

Drehung im 2 dm-Rohr — 0,12.

Daraus folgt, daß

$$0,12 \times \frac{24}{100} \times \frac{1530}{100} = 0,441 \text{ g}$$

Glucuheptonsäurelacton wieder ausgeschieden worden sind.

Am 3. Tage war die Harnmenge 820 ccm.

Die Drehung von 100 ccm durch Einengen usw. auf 24 ccm gebrachten Harnes war im 2 dm-Rohr — 0,2<sup>1)</sup>.

$$0,2 \times \frac{24}{100} \times \frac{820}{100} = 0,394 \text{ g}$$

Glucuheptonsäurelacton wurden also noch am 3. Tage ausgeschieden.

In den 3 Tagen sind zusammen 7,632 g Glucuheptonsäurelacton = 28,2% der eingegebenen Menge wieder im Urin erschienen.

Der Kot der 3 Tage wog zusammen 230 g; er wurde mit Wasser zerrieben und 2 Stunden stehen gelassen, nachher abfiltriert und 3 mal mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wurde bis auf 50 ccm eingeengt. 10 ccm davon wurden unter Zusatz von 2 ccm HCl und von Knochenkohle gekocht. Das Filtrat wurde auf 12 ccm gebracht und nach 1 tägigem Stehen polarisiert.

Die Drehung war im 2 dm-Rohr — 0,4.

Daraus berechnet sich, daß

$$0,4 \times \frac{12}{100} \times \frac{50}{10} = 0,24 \text{ g}$$

Glucuheptonsäurelacton im Kote vorhanden waren. 1,2% der ein-

<sup>1)</sup> Vgl. die Anmerkung 3 auf S. 424.

gegebenen Substanz war unresorbiert. (Der Grund liegt wahrscheinlich darin, daß bei dem Tiere am 1. Tage ganz leicht erweichter Stuhlgang zu beobachten war; Diarrhöe trat jedoch nicht ein.)

b) Bei diesem Versuch wurden 30,0 g Glucuheptonsäurelacton innerhalb eines Tages, aber in 3 Portionen mit 3 bis 4stündigem Intervall dem Tiere in 33%iger wässriger Lösung per Schlundsonde verabfolgt. 3 Tage lang wurden Harn und Kot gesammelt. Die Drehung wurde nach den Angaben des Versuches 1 bestimmt.

Am 1. Tage belief sich die Harnmenge auf 1190 ccm.

100 ccm Harn wurden nach Kochen mit HCl auf 24 ccm eingengt. Drehung im 2 dm-Rohr — 2,8.

Also vorhanden

$$2,8 \times \frac{24}{100} \times \frac{1190}{100} = 7,997 \text{ g}$$

Glucuheptonsäurelacton.

Schon am 1. Tage waren also 7,8 g = 26,7% von der eingegebenen Menge wieder ausgeschieden worden.

Am 2. Tage betrug die Harnmenge 1680 ccm.

Drehung im 2 dm-Rohr — 0,35 (von 100 ccm mit HCl vorbehandeltem und auf 24 ccm gebrachtem Urin).

Demnach sind

$$0,35 \times \frac{24}{100} \times \frac{1680}{100} = 1,411 \text{ g}$$

wieder ausgeschieden.

Am 3. Tage war die Harnmenge 1390 ccm.

Drehung im 2 dm-Rohr — 0,3 (100 ccm Harn mit HCl erhitzt und auf 24 ccm konzentriert).

Es waren also noch

$$0,3 \times \frac{24}{100} \times \frac{1390}{100} = 1,001 \text{ g}$$

Glucuheptonsäure vorhanden.

Im ganzen wurden in 3 Tagen 10,41 g oder 34,7% unverbrauchtes Glucuheptonsäurelacton im Harn wiedergefunden.

Der Kot des Hundes betrug 220 g in den 3 Versuchstagen. 10,0 ccm des im ganzen auf 50 ccm eingengten wässrigen Kotalzuges wurden nach Behandlung mit HCl und Knochenkohle auf 12 ccm gebracht. Die Drehung war im 2 dm-Rohr — 0,2.

Demnach sind

$$0,2 \times \frac{12}{100} \times \frac{50}{10} \times 0,12 \text{ g}$$

Glucuheptonsäurelacton vorhanden.

Im Kote fanden sich also 1,2 g = 0,4% der Gesamtmenge wieder.

c) 10,0 g Glucuheptonsäurelacton in 30 ccm Wasser wurden per Schlundsonde dem Tier eingegeben.

Harn und Kot von 3 Tagen wurden wie im Versuche a und b untersucht.

Am 1. Tage war die Harnmenge 1680 ccm.

Drehung im 2 dm-Rohr — 1,3 (100 ccm Urin, nach Behandlung mit HCl und Knochenkohle auf 24 ccm gebracht).

Daraus ergibt sich für die Gesamtharmmenge

$$1,3 \times \frac{24}{100} \times \frac{1680}{100} = 5,242 \text{ g}$$

#### Glucuheptonsäurelacton.

In 24 Stunden sind also 52,4% der verabfolgten Substanzmenge wieder ausgeschieden.

Am 2. Tage betrug die Harnmenge 1540 ccm.

Keine Drehung mehr; ebenso am 3. Tage.

Demnach konnte hier konstatiert werden, daß bei diesem Versuche am 1. Tage über die Hälfte des verabreichten Glucuheptonsäurelactons unverändert ausgeschieden war.

Im wässrigen Extrakte des 3 Tage hinduroh gesammelten Kotes konnte keine Drehung festgestellt werden.

d) Denselben Tiere wurden 5,0 g Glucuheptonsäurelacton, in 20 ccm Wasser gelöst, nochmals per Schlundsonde verabfolgt. Die Bestimmung der Drehung wurde wie in den anderen Versuchen ausgeführt.

Am 1. Tage Harnmenge 1710 ccm.

Drehung der mit HCl behandelten, auf 24 ccm eingeeengten und entfärbten Harnprobe von 100 ccm im 2 dm-Rohr — 0,7.

Dementsprechend sind vorhanden

$$0,7 \times \frac{24}{100} \times \frac{1710}{100} = 2,873 \text{ g}$$

#### Glucuheptonsäurelacton.

In 24 Stunden sind also 57,5% wieder ausgeschieden.

Am 2. Tage Harnmenge: 1800 ccm.

Drehung + 0,2 (100 ccm Harn nach üblicher Vorbehandlung auf 24 ccm gebracht).

Am 3. Tage Harnmenge: 1730 ccm.

Keine Drehung nach entsprechender Konzentration und Vorbehandlung.

Der Kot von 3 Tagen wog 170 g.

Ausführung der Drehungsbestimmung wie im vorausgehenden Versuche.

Drehung war + 0,2.

Bei diesem Versuch ist also vom Glucuheptonsäurelacton über die Hälfte in 24 Stunden wieder ausgeschieden.

e) Denselben Hunde wurden 5,0 g Glucuheptonsäurelacton in 20 ccm H<sub>2</sub>O nicht per Schlundsonde, sondern subcutan beigebracht.

Harnmenge nach 24 Stunden: 810 ccm.

100 ccm Urin wurden eingeeengt und mit HCl plus Knochenkohle gekocht. Nach Auffüllung auf 24 ccm war die Drehung — 1,2.

Also waren

$$1,2 \times \frac{24}{100} \times \frac{810}{100} = 2,333 \text{ g}$$

Glucuheptonsäure im Harn vorhanden.

Harnmenge von 2 weiteren Tagen 1800 ccm.

Drehung nach Vorbehandlung und Konzentration: 0.

Bei subcutaner Verabfolgung wurden demnach 46,7% der eingegebenen Menge nicht verwertet und sofort ausgeschieden.

Es ergibt sich, daß bei der Verabfolgung von größeren Mengen des Präparates die Ausscheidung mehrere Tage andauern kann, wobei die Hauptmenge schon nach 24 Stunden im Harn erscheint. Bei kleineren Dosen, die pro Kilo des Körpergewichts 1 g nicht übersteigen, ist die Ausscheidung von unverwerteter Substanz in 24 Stunden praktisch beendet. Bei kleineren Mengen scheint kein wesentlicher Unterschied im Verhalten nach oraler oder subcutaner Zufuhr zu bestehen.

Die Toleranz für Glucoheptonsäurelacton schwankte bei meinem Versuchshunde an den verschiedenen Tagen; bei kleineren Dosen wurde unter Umständen mehr ausgeschieden als bei größeren. Immerhin wurden ansehnliche Quantitäten verbrannt, z. B. bis zu 72%.

#### Gewinnung von Glucoheptonsäurephenylhydrazid aus Hundeharn.

Außer durch Isolierung in Substanz läßt sich Glucoheptonsäure im Urin auch in Form ihres Phenylhydrazids charakterisieren.

2000 ccm Hundeharn vom Versuch 1 wurden mit 5,0 ccm Phenylhydrazin und 7 ccm Essigsäure versetzt und auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingeeengt. Nach zweitägigem Stehen in der Kälte wurde der ausgeschiedene rötliche Niederschlag auf der Nutsche abfiltriert, mit etwas kaltem Wasser und dann zweimal mit Ather ausgewaschen. Der Niederschlag wurde in einem Kolben mit Wasser aufgekocht, wobei ein Teil ungelöst blieb, heiß filtriert, dann stehen gelassen. Der nunmehr abgeschiedene Niederschlag wurde abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen, in heißem gelöst und die siedende Flüssigkeit mit Tierkohle entfärbt.

Das Filtrat läßt nach dem Einengen und Stehen einen gelbstichigen krystallinischen Niederschlag fallen, der abgesaugt und im Vakuum getrocknet wurde. Die Mutterlauge lieferte noch etwas derselben Verbindung.

Ausbeute 0,72 g; Schmelzpunkt 170 bis 171°.

0,1742 Substanz gaben 13,9 ccm N (18°, 746 mm)

$C_{13}H_{20}O_7N_2$ : Ber. N = 8,86%; gef. N = 9,02%.

Zusammensetzung und Eigenschaften der, wie beschrieben, gründlich gereinigten Substanz stimmen mit den Angaben von

E. Fischer und Passmore<sup>1)</sup> für reines  $\alpha$ -Glucoheptonsäurehydrazid völlig überein.

### III. Versuche am Menschen.

a) Versuch an K. (Körpergewicht: 50,5 kg).

Es wurden 20,0 g Glucoheptonsäurelacton in 2 Portionen, in Seltenerwasser gelöst, eingenommen.

24stündige Harnmenge 1430 ccm.

100 ccm davon wurden zunächst eingeengt und nach dem Kochen mit 2 ccm Salzsäure und einer Messerspitze Knochenkohle, Filtration usw. bis auf 24 ccm gebracht. Drehung in 2 dm-Rohr + 0,2. Die Natur der rechtsdrehenden Substanz habe ich nicht aufklären können; jedenfalls hat sich keine Glucoheptonsäure nachweisen lassen, die demnach wohl vollständig verbrannt war.

b) Dieselbe Versuchsperson nahm dann die doppelte Menge, also 40,0 g Glucoheptonsäurelacton, in 4 Portionen in wässriger Lösung mit je 2 Stunden Pause.

24stündige Harnmenge 1450 ccm.

100 ccm Harn wurden nach den mehrfach gemachten Angaben behandelt.

Drehung in 2 dm-Rohr — 3,6. (100 ccm nativer Urin unter Salzsäurebehandlung auf 24 ccm gebracht).

Also sind

$$3,6 \times \frac{24}{100} \times \frac{1450}{100} = 12,54 \text{ g}$$

Glucoheptonsäurelacton in der Gesamtharnmenge zugegen. Nahezu  $\frac{1}{3}$  der verabfolgten Substanz ist also wieder ausgeschieden.

Es ist bemerkenswert, daß bei direkter Untersuchung des nativen Harns keine deutliche Drehung erkannt werden konnte; erst die Behandlung mit HCl offenbarte den reichlichen Übergang unverwerteter Substanz in den Urin. (Bei der Versuchsperson K. trat übrigens Durchfall ein.)

c) Versuch an P. (Körpergewicht: 68,3 kg).

30,0 g Glucoheptonsäurelacton wurden in Wasser gelöst auf einmal genommen.

Die Harnmenge betrug 1370 ccm.

$\alpha$ ) Drehung bei direkter Untersuchung des Harns: 0.

$\beta$ ) Eine Drehung war auch nicht sicher wahrzunehmen, als 100 ccm Harn bis auf 20,0 ccm eingeengt und nach Zusatz allein von Alkohol mit Knochenkohle gekocht, dann filtriert und auf 30 ccm gebracht waren.

$\gamma$ ) Dagegen war die Drehung nach Behandlung mit Salzsäure plus Knochenkohle, wobei gleichzeitig 100 ccm Urin auf 24 ccm gebracht wurden, im 2 dm-Rohr — 2,5.

<sup>1)</sup> E. Fischer und Fr. Passmore, Ber. 22, 2732, 1889.



Daraus berechnet sich ein Gehalt von

$$2,5 \times \frac{24}{100} \times \frac{1370}{100} = 8,22 \text{ g}$$

Glucuheptonsäurelacton. Also sind 27,4% der eingenommenen Substanz wieder ausgeschieden.

d) Versuch an N. (Körpergewicht: 75 kg).

Es wurden 40,0 g Glucuheptonsäure in 200 ccm Wasser in vier Portionen mit Pausen von 2 $\frac{1}{2}$  bis 3 Stunden eingenommen.

Harnmenge 1200 ccm.

$\alpha$ ) Bei direkter Untersuchung betrug die Drehung im 2 dm-Rohr +0,1.

$\beta$ ) 100 ccm Harn polarisierten nach Vorbehandlung mit Salzsäure und nach Konzentration auf 24 ccm in 2 dm-Rohr — 1,7.

Daraus ergibt sich, daß

$$1,7 \times \frac{24}{100} \times \frac{1200}{100} = 4,90 \text{ g}$$

Glucuheptonsäure im Gesamtharn vorhanden waren. 12,3% der Gesamtmenge wurden wieder ausgeschieden.

Auf eine Untersuchung des Kotes beim Menschen wurde verzichtet. Die beiden letzten Versuchspersonen hatten über keine Verdauungsstörungen zu klagen.

Wie man sieht, bestehen beim Menschen nicht unerhebliche individuelle Verschiedenheiten in der Toleranz für  $\alpha$ -Glucuheptonsäurelacton.

Die bisherigen Angaben über die Unschädlichkeit des Mittels und seine teilweise Zerstörung im Organismus kann ich bestätigen, dagegen kann nach meinen Befunden die Ausscheidung unverwerteter Substanz erheblich größer sein, als bisher angenommen worden ist.

---

# Über die Bestimmung von Phenol und Parakresol in ihren Gemischen.

Von

M. Siegfried und R. Zimmermann.

(Aus der chem. Abteilung des Physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1911.)

Das Bedürfnis, für die Bestimmung des p-Kresols und Phenols getrennt im Harn eine Methode zu besitzen, hatte zur Ausarbeitung der von uns beschriebenen Methode geführt<sup>1)</sup>. Bis dahin gab es keine Methode, die die getrennte Bestimmung von Phenol und p-Kresol im Harn gestattet hätte. Man mußte sich damit begnügen, nach Kossler und Penny Jodzahlen für Phenol und p-Kresol zusammen zu gewinnen und diese entweder auf Phenol oder Kresol zu berechnen.

Die Grundidee unserer Methode war folgende: Auf 2 verschiedenen Wegen sollte einmal Phenol + Parakresol in Summa bestimmt werden, einmal das Parakresol in der einen, das andere Mal in einer anderen Form. Die Berechnung der beiden unbekanntem Mengen Phenol und Kresol erfordert 2 Gleichungen, die durch die beiden Bestimmungen gegeben werden sollten. So gelangten wir, nachdem wir zunächst vergebliche Versuche zum zweiten Wege durch Oxydation des Kresols mit Bromwasser, zu denen wir durch unrichtige Angaben in der Literatur veranlaßt wurden, ausgeführt hatten, zu unserer Methode.

Ganz anders liegen die Verhältnisse, wenn das Gewicht der Summe des Phenols und Kresols gegeben ist, wie bei technischen Untersuchungen. Da ergibt die eine der erforderlichen Gleichungen das Gewicht der Summe. Man kann dann<sup>2)</sup> nach Kossler und Penny oder neuerdings nach dem ersten Teile

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 29, 368, 1910.

<sup>2)</sup> M. Siegfried und R. Zimmermann, diese Zeitschr. 37, 383, 1910.

unserer Methode ( $b_1$ -Bestimmung) aus den für die Summe von Phenol und Kresol erhaltenen Jod- resp. Bromwerten und aus der bekannten Summe der Gewichte des Phenols und Kresols die Mengen des Phenols und Kresols getrennt berechnen.

Eine solche Berechnung, zwar nicht unter Benutzung der Methode von Kossler und Penny, sondern nach Versuchen, bei denen das Phenol als Tribromphenol, das p-Kresol als Dibromparakresol nach einem modifizierten Verfahren Koppeschaars bestimmt wurden, haben unseres Wissens zuerst Ditz und Cedivoda<sup>1)</sup> durchgeführt.

Zur getrennten Bestimmung des Phenols und p-Kresols in Lösungen, also in den Fällen, bei denen die Summe beider Phenole nicht bekannt ist, wie bei den Bestimmungen im Harne, kann man also weder die Methode von Kossler und Penny, noch das Verfahren von Ditz und Cedivoda benutzen.

Da D. und C. angeben, das Parakresol bei ihren Arbeitsbedingungen als Dibrom-p-Kresol zu erhalten, so hofften wir für die  $b_2$ -Bestimmung unserer Methode die von D. und C. in ihren Versuchen gewählten Bedingungen anwenden zu können. Leider fanden wir, daß dieses nicht möglich ist.

Neuerdings suchen H. Ditz und Fr. Bardach<sup>2)</sup> darzutun, daß man unter den von D. und C. benutzten Versuchsbedingungen doch genaue Werte erhalte.

D. und B. beschwerten sich zunächst ausführlich und unter Überschreitung der Grenze der Sachlichkeit<sup>3)</sup>, daß wir zwar die seinerzeit von Russig und Fortmann<sup>4)</sup> erfolgten Angriffe erwähnt, nicht aber die Erwiderung von Ditz. Zweifellos war das eine Unterlassungssünde, wir haben jedoch in einem bereits am 29. Juli d. J. ausgegebenen Hefte dieser Zeitschrift versucht, sie wieder gut zu machen. Da aber D. und B. in ihrer am 19. Oktober der Redaktion eingereichten Mitteilung diesen Nachtrag ignorieren und zu den weitgehendsten Vermutungen aus dem Unterbleiben des Zitates der Erwiderung von D. gelangen<sup>5)</sup>,

<sup>1)</sup> H. Ditz und Fr. Cedivoda, Zeitschr. f. angew. Chem. 1899, 873.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. 37, 272, 1911.

<sup>3)</sup> l. c. 276.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. angew. Chem. 1901, 157.

<sup>5)</sup> D. und B. geben in einer Anmerkung an, daß ihnen diese Zeitschrift nicht zugänglich sei und daß sie auf unsere zweite Mitteilung erst durch ein Referat aufmerksam geworden seien.

muß ich auf unsere Unterlassungssünde nochmals zurückkommen: Eigentlich hätten wir die Entgegnung von Russig und Fortmann überhaupt nicht anzuführen brauchen, da diese keine Versuche mit Phenol oder mit Gemischen von Phenol mit p-Kresol angeben, darin stimmen wir mit D. und B. überein. Damit erledigte sich auch die Erwiderung von D. und C. für uns. Daß wir aber die erstere zitiert, die zweite nicht zitiert haben, lag daran, daß wir die Erwiderung von D., weil sie keine neuen Versuche brachte und teilweise humoristisch gehalten<sup>1)</sup> war, nicht so beachtet hatten, daß wir uns später derselben erinnern hätten.

Wenn man sieht, wie eifrig sich D. und B. bemühen, unser Urteil über die Brauchbarkeit der Arbeitsweise von D. und C. zu entkräften, wird man erstaunt sein zu hören, daß von D. und C. überhaupt nicht ein einziger Versuch mit einem Gemenge von Phenol und Kresol allein mitgeteilt worden ist. Es werden solche mit Phenol allein, Parakresol allein und solche, bei denen Phenol, Parakresol und andere Kresole gemengt vorlagen, mitgeteilt. Selbstverständlich sind diese nicht maßgebend für Gemenge von Phenol und p-Kresol allein, da hier Kompensierungen eintreten können. Eine bestimmte Vorschrift ist ebenfalls nicht gegeben; man ersieht die Arbeitsweise eben nur aus Versuchen, von denen aber, wie gesagt, keine von Gemengen des Phenols und Parakresols vorhanden sind. Soviel geht jedoch aus der Mitteilung von D. und C. hervor, daß für die Überführung des Parakresols die Dauer der Einwirkung des Broms — genau 1 Minute — wesentlich ist, und diese Bedingung hatten wir bei unseren Versuchen peinlich eingehalten.

Der eine von uns wurde von Herrn Prof. Ditz brieflich darauf aufmerksam gemacht, daß wir zu großen Bromüberschuß und eine andere Salzsäurekonzentration als D. und C. angewandt hätten. Beide Momente werden auch jetzt von D. und C. urgiert. D. und C. hatten als Bezeichnung der Konzentration der Salzsäure lediglich angegeben: (1 : 1). Wir nahmen daher an, daß D. und C. eine aus gleichen Teilen konzentrierter Salz-

---

<sup>1)</sup> D. sagt S. 162: „Wiewohl ich also nach dem schon Gesagten gar keine Veranlassung hätte, mir die Köpfe der Herren Russig und Fortmann zu zerbrechen, will ich usw.“

säure und Wasser hergestellte Mischung verwendet hätten, und benutzten eine solche, nämlich, wie ausdrücklich in unserer Mitteilung angegeben, 12,5%ige. Jetzt sagen D. und B., als konzentrierte Salzsäure bezeichne man eine solche von ca. 37% und nicht von ca. 25%. Hier ist dies nicht der Fall. Man nennt ca. 25%ige Salzsäure konzentrierte, die ca. 37%ige rauchende (*Acidum hydrochloricum fumans*). Ebenso bezeichnet die österreichische Pharmakopoe die 23,86%ige Salzsäure als *Acidum hydrochloricum concentratum*. Wenn im Prager Laboratorium ein so abweichender Gebrauch herrscht, der im Gegensatz zur Pharmakopoe des eigenen Landes die rauchende zirka 37%ige Salzsäure als „gewöhnliche konzentrierte“ bezeichnet, hätte man erwarten sollen, daß D. und C. diesen Gebrauch nicht als bekannt vorausgesetzt, sondern, da es für die Konzentration der verwendeten Salzsäure von Wichtigkeit sein soll, diese Konzentration auch näher bezeichnet hätten.

Der eine von uns (Siegfried) hat infolge der brieflichen Mitteilung des Herrn Prof. Ditz unter Verwendung der 18,5%igen Salzsäure und unter Vermeidung eines großen Bromüberschusses Bestimmungen nach der von Ditz und Cedivoda angewandten Arbeitsweise mit Gemengen von Phenol und Parakresol ausgeführt und ist zu demselben Resultate wie wir früher gelangt, daß nach der Arbeitsweise von D. und C. keine brauchbaren Werte erhalten werden.

**Erneute Nachprüfung der von Ditz und Cedivoda auf Gemische von Phenol, p-Kresol und andere Kresole angewandten Arbeitsweise unter Anwendung auf Gemische von Phenol und p-Kresol.**

Phenollösung: 3,0248 g frisch destillierten Phenols zu einem Liter gelöst. 10 ccm der Lösung enthielten also 0,030248 g Phenol.

Nach Koppeschaar wurden in 10 ccm gefunden: 0,03025 g Phenol.

p-Kresollösung: 4,1890 g frisch destillierten p-Kresols wurden zu einem Liter gelöst. 10 ccm der Lösung enthielten also 0,04189 g p-Kresol. Nach Keppler wurden gefunden in 10 ccm: 0,0414 g p Kresol.

Thiosulfatlösung:  $\frac{1}{10}$ .

Bromatbromidlösung, aus Kaliumbromat und Kaliumbromid hergestellt: 10 ccm = 10,05 ccm  $\frac{2}{10}$ .

Versuch 1. 10 ccm Phenollösung, 10 ccm p-Kresollösung, 10 ccm HCl 18,5%, 40 ccm Bromatbromidlösung. Zurücktitriert 6,7 ccm Thiosulfatlösung, verbraucht Br: 0,2677 g; an Phenol + Kresol gebundenes Br gefunden: 0,1339 g. Berechnet: 0,1391, Differenz absolut: - 0,0051 g Br, Differenz relativ: - 3,7%.

Versuch 2. Ebenso wie Vers. 1. Zurücktitriert 7,3 ccm Thiosulfatlösung gebundenes Br: 0,2629 g. An Phenol + Kresol gebundenes Br gefunden: 0,1315 g; berechnet 0,1391. Differenz absolut: - 0,0076 g, relativ: - 5,5%.

Versuch 3. Ebenso wie Vers. 1. Zurücktitriert 6,7 ccm Thiosulfatlösung. Differenz also wie Vers. 1 absolut: - 0,0051, relativ: - 3,7%.

Versuch 4. Ebenso wie die vorigen Versuche, jedoch nur 35 ccm Bromatbromidlösung verwendet. Zurücktitriert 2,8 ccm Thiosulfatlösung. Gebundenes Brom gefunden: 0,2589 g. An Phenol + Kresol gebundenes Br: 0,1295 g; berechnet: 0,1391. Differenz absolut: - 0,0096, relativ: - 6,9%.

Versuch 5. Ebenso wie Vers. 4. Zurücktitriert 2,9 ccm. An Phenol + Kresol gebundenes Br gefunden: 0,1290; berechnet: 0,1391. Differenz absolut: - 0,0101 g, relativ: + 7,3%.

D. und C. hatten nur 2 Bestimmungen mitgeteilt, in denen Phenol und p-Kresol in den Lösungen vorhanden waren, und zwar eine, bei der ein Gemisch von Phenol, p-Kresol und o-Kresol, die andere, bei der ein Gemisch von Phenol, p-Kresol, o-Kresol und m-Kresol verwendet wurde. In der ersten betrug die Menge des nicht verbrauchten Broms 27% vom verbrauchten Brom, in der anderen 23%.

In den hier mitgeteilten Versuchen 1 und 3 betrug die Menge des nicht verbrauchten Broms 20%, in Versuch 2 22%. Der theoretische Bromüberschuß beträgt bei dem zweiten hier angeführten Versuche von D. und C. 22%, in den von uns mitgeteilten Versuchen 1 bis 3 13%.

Der hier gewählte Bromüberschuß ist also etwas niedriger als der von D. und C. angewendete. Da bei den Versuchen 4 und 5, bei denen der Bromüberschuß geringer als bei 2 und 3 war, noch größere Differenzen erhalten wurden, wurden weitere Versuche unter Verwendung der gleichen Lösungen wie in den Versuchen 1 bis 5 angestellt, bei denen ein viel größerer Überschuß von Brom verwendet wurde.

Versuch 6. 10 ccm Phenol, 10 ccm p-Kresol. Bromatbromidlösung 50 ccm. Zurücktitriert: 15,7 ccm Thiosulfatlösung. Gebundenes Brom:

0,2761 g; an Phenol + Kresol gebundenes Br: 0,1381 g. Ber.: 0,1391. Differenz absolut:  $-0,0010$  g, relativ:  $-0,7\%$ .

Versuch 7 ebenso, jedoch 45 ccm Bromatbromidlösung. Zurücktitriert: 10,9 ccm Thiosulfatlösung. Gebundenes Brom: 0,2741 g; an Phenol + Kresol gebundenes Br: 0,1321. Ber.: 0,1391. Differenz absolut:  $-0,0070$  g, relativ:  $-5,0\%$ .

In Versuch 6 betrug der theoretische Bromüberschuß  $44\%$ , es wurde zwar ein genaues Resultat erhalten, aber immer noch zu wenig gebundenes Brom. In Versuch 7 betrug der theoretische Bromüberschuß  $30\%$ , es wurden trotz dieses großen Überschusses noch  $5\%$  zu wenig Brom gebunden.

Ditz und Bardach teilen jetzt Versuche mit, bei denen sie unter Beibehaltung der von D. und C. angegebenen Bedingung, einminutenlanges Schütteln nach Zusatz der Bromidbromatlösung und Salzsäure, und bei Verwendung von  $30\%$  Bromüberschuß genauere Werte erhalten haben. Ja, sie finden sogar bei  $25\%$  Bromüberschuß genauere Werte als bei  $30\%$ . Die Differenzen ihrer und unserer Ergebnisse haben möglicherweise ihren Grund in der subjektiven Art des Schüttelns. Bei kräftigerem Schütteln ballt sich vielleicht der Niederschlag zu stark zusammen, noch ehe die nötige Menge Brom aufgenommen ist, so daß die kurze Zeit von 1 Minute im ganzen nicht genügt, daß alles Brom gebunden wird. Bei unserem Verfahren, dem modifizierten Koppeschaarschen, zur Bestimmung von  $b_2$ , wird das Schütteln sorgfältigst vermieden. „Es kommt hierbei hauptsächlich darauf an, daß der entstehende Niederschlag sehr feinflockig ausfällt, was man nur durch ganz vorsichtiges Umschwenken erzielt.“

Deshalb würde die Arbeitsweise von D. und C. nicht geeignet sein für die Bestimmung von  $b_2$  in unserer Methode, auch nicht, wenn sich ein Weg finden würde, für Gemische von Phenol und p-Kresol, deren Summe unbekannt ist, den nötigen Bromüberschuß zu ermitteln. Der Vorschlag, den D. und B. machen, durch einen Vorversuch diese Menge zu ermitteln, ist schon deshalb nicht empfehlenswert, weil man bei Bestimmung des Phenols und p-Kresols im Harne nur geringe Mengen der Phenole zur Verfügung hat und deshalb nicht gerne zu den zwei nach unserer Methode erforderlichen Titrierungen eine dritte fügen möchte.

Bei dieser Gelegenheit möchten wir einen Irrtum von D. und B. berichtigen; dieselben glauben, unser Verfahren zur

Bestimmung von  $b_2$  in unserer Methode sei ein modifiziertes Verfahren von D. und C. Sowohl das Verfahren von D. und C. ist eine Modifikation des Verfahrens von Koppeschaar, als das unsrige  $b_2$ -Verfahren.

Gegen die Art, mit der D. und B. unsere Resultate diskutieren, um scheinbar Fehler unserer  $b_2$ -Methode festzustellen, müssen wir ernste Verwahrung einlegen. Sie vergleichen die Werte, die sie selbst für Phenol und p-Kresol erhalten haben, wenn die Summe der Gewichte bekannt ist, mit den Werten, die wir erhalten haben, wenn die Summe der Gewichte beider unbekannt ist.

Wenn die Summe des Kresols und Phenols bekannt ist, hat man nur eine Bestimmung auszuführen. Lediglich die Fehler dieser einen Bestimmung beeinflussen das Resultat. Ist die Summe unbekannt, hat man zwei verschiedenartige Bestimmungen auszuführen, deren jeder Fehler natürlich das Resultat beeinflußt. Dazu kommt die ganz andersartige Berechnung in dem einen und in dem anderen Falle. Es ist doch ganz selbstverständlich und ganz klar, daß man nur die nach der einen Arbeitsweise erhaltenen Werte für gebundenes<sup>1)</sup> Brom mit den berechneten und die nach der anderen Arbeitsweise erhaltenen Werte gebundenes Brom mit den berechneten vergleichen kann. Wir werden jetzt zeigen, wie groß die Fehler bei den von D. und C. aus unserer Tabelle ausgesuchten Bestimmungen sind und wie groß sie nach Darstellung von D. und B. erscheinen. Als erstes Beispiel führen D. und B. S. 289 den Versuch 3 auf S. 387 unserer Arbeit an.

In unserer Arbeit ist angegeben für  $b_2$  gefunden 0,1767 g, für angewandtes Phenol 0,0190, für angewandtes Kresol 0,0263 g. An Phenol + Kresol gebundenes Brom ist also gefunden: 0,0884, berechnet: 0,0874. Differenz also 0,0010 g = 1,13‰.

D. und B. hingegen führen unsere gefundenen Phenol- und Kresolwerte und die prozentuale Differenz für Kresol = - 5,3‰, für Phenol = + 4,7‰ an.

Eine Methode, die nur 0,001 g Brom = 1,13‰ der berechneten Menge, die also absolut nur 0,0874 g beträgt, Fehler bringt, wird niemand tadeln.

<sup>1)</sup> Und zwar entweder das überhaupt gebundene oder nur das an Phenol und Kresol gebundene Brom, letzteres die Hälfte des ersteren.



Berechnet man ebenfalls aus den von D. und B. mitgeteilten Zahlen den Bromwert, so erhält man: Angewandt: Kresol 0,12335 g, Phenol 0,07129 g. Br gefunden: 0,1835, berechnet: 0,1821 g, absolute Differenz: 0,00145, prozentual: 0,74%.

Der absolute Fehler ist also etwas größer wie unserer, der relative kleiner, dabei haben D. und B. mehr als die vierfache Substanzmenge genommen als wir!

Bei allen analytischen Methoden sind einmal Fehler vorhanden, die prozentual mit der Menge der Substanz wachsen und sich dann als relative Fehler bei verschiedenen großen angewandten Mengen in derselben Größe zeigen. Dann aber gibt es bei allen Methoden absolute Fehler, die sich bei größeren angewandten Substanzmengen im Verhältnis ihrer größeren Menge weniger geltend machen, als bei geringen Mengen. Beträgt bei irgendeiner analytischen Bestimmung der absolute Fehler 1 mg, so bewirkt dieser bei Verwendung von 10 mg 10% Differenz, bei Verwendung der fünfmal größeren Menge von 50 mg nur 2%. Wie würden D. und B. urteilen, wenn jemand zwei verschiedene Methoden der Kohlenstoffbestimmungen auf ihre Fehler vergleichen wollte, und bei der einen Methode 0,1 g Bernsteinsäure, bei der anderen nur 0,025 g anwendete!

Als zweites Beispiel führen D. und B. (S. 290) den Versuch 7 S. 387 unserer Arbeit an. Dort sind angewandt Kresol 0,0079 g, Phenol 0,0380 g.  $\frac{b_a}{2}$  gefunden: 0,1075 g, berechnet: 0,1086. Differenz absolut: 0,0011 g = 1,0%.

Hingegen führen D. und B. an als Fehler für gefundenes Kresol + 26,6%, Phenol - 4,2%.

Berechnet man das an Phenol und Kresol gebundene Brom in dem Versuche von D. und B., so findet man aus 0,0637 g Phenol und 0,0137 g Kresol gefundenes Brom: 0,1813 g, berechnet: 1825 g. Differenz absolut: 0,0012 g, relativ: 0,67%.

Bei dem nächsten von D. und B. (S. 296) angezogenen Versuche von uns (Versuch 5, S. 387) ist  $\frac{b_a}{2}$  gefunden: 0,1284, berechnet: 0,1279. Differenz absolut: 0,0005 g, relativ: 0,39%.

D. und B. referieren die prozentualen Fehler für Kresol: - 12,8%, Phenol: - 4,5%.

Bei dem Versuch von D. und B. ergibt sich als absolute Differenz nur 0,0003 g, relativ: 0,19%.

Bei dem vierten (der Reihe nach) von D. und B. (S. 297) angezogenen Versuche unserer Arbeit (Versuch 1 S. 379) ergibt sich an Phenol + Kresol gebundenes Brom gefunden: 0,0636, berechnet: 0,0627 g, absolute Differenz: 0,0011 g, relative: 1,7%.

D. und B. referieren die prozentualen Fehler für Kresol:  $-3,5\%$ , für Phenol:  $+29,0\%$ .

Im Vergleichsversuch, bei dem D. und B. die ca. 2,5fache Menge unserer Substanzmenge verwendet haben, beträgt der absolute Fehler 0,0009 g Brom, der relative  $0,6\%$ , dabei differieren Einzelbestimmungen um mehr als das dreifache der Fehler untereinander.

Da D. und B. Werte für Phenol und p-Kresol aus unserer Arbeit anziehen, die die Gesamtmethode als ungenau erscheinen lassen könnten, müssen wir hier auf die Genauigkeit unserer Gesamtmethode eingehen. In der Tabelle S. 387 unserer Arbeit haben wir sieben Gesamtbestimmungen veröffentlicht, bei denen die Menge des Phenols ansteigt, die des p-Kresols fällt. Die Versuche zeigen, daß die Methode auch brauchbar ist, wenn relativ sehr wenig Phenol neben relativ sehr viel Kresol vorhanden ist und umgekehrt. Es ist klar, daß, wenn in Nr. 1 der Tabelle anstatt 0,0038 g Phenol 0,0041 g gefunden werden, der Fehler sehr klein, nämlich nur 0,0003 g ist. Trotzdem ist der relative Fehler  $8\%$ . Selbstverständlich ist es nicht möglich, mit so kleinen Mengen Phenol eine Bestimmung von großer relativer Genauigkeit auszuführen. Wenn man aber deshalb sagen wollte, wir hätten mit Unrecht diesen Versuch angestellt, um die Methode zu prüfen, so wäre dies unzutreffend. Er beweist nämlich, daß, selbst wenn 0,0038 g Phenol vorhanden sind, doch die gleichzeitig vorhandenen 0,0263 g p-Kresol bestimmt werden können. Es wurden statt 0,0263 g Kresol 0,0261 g gefunden, der Fehler beträgt also  $0,0002\text{ g} = 0,8\%$ .

Da es vorkommt, daß die absoluten Werte von Phenol und Kresol infolge der Möglichkeit, daß die Fehler der  $b_1$  und  $b_2$ -Methode sich addieren, 1 ja 2 mg von den Sollwerten differieren, kann die prozentuale Abweichung groß werden, wenn nur sehr kleine Mengen Phenol bzw. Kresol vorhanden sind.

## Ob und wie die Bestandteile der Gehirnsubstanz sich bei normalen und Hungertieren verändern.

Von

Raffaele Paladino.

(Aus dem chemisch-physiologischen Institut der Universität zu Neapel.)

(Eingegangen am 22. Dezember 1911.)

Es ist allgemein bekannt, daß die chemische Zusammensetzung der Gehirnsubstanz ganz anders ist als die der anderen Organe. Man findet in der Gehirnsubstanz spezifische, in warmem Alkohol lösliche Stoffe, deren Isolierung und Untersuchung meist schwierig ist. Man findet darin außerdem Cholesterin und Lecithin und andere in Äther lösliche Substanzen, die noch ungenügend bekannt sind. Ferner Eiweißstoffe, Nucleoproteide, Neurokeratin, in Wasser lösliche Extraktivstoffe, Milchsäure, Kreatin, Harnstoff, Harnsäure, Nucleinbasen, Cholin, Inosit, an Salzsäure gebundene anorganische Kalium-, Natrium-, Calcium- und Magnesiasalze, Phosphorsäure, Kohlensäure und geringe Mengen Schwefelsäure.

Es erschien von Interesse festzustellen, welchen quantitativen Veränderungen diese verschiedenen Bestandteile der Gehirnsubstanz unter besonderen Verhältnissen — z. B. bei Hungertieren — unterworfen sind. Die im folgenden angeführten Untersuchungen stellte ich auf Anregung von Prof. Malerba an. Sie sind vielleicht deswegen interessant, da uns noch praktische Beweise fehlen hinsichtlich der Behauptung, daß das Gehirn unter allen Organen dasjenige sei, das am wenigsten im Zustande der Inaction einbüße.

Chemische Analysen an den Zentralnervengorganen wurden angestellt von Halliburton, Geoghegan, Lesene, Jacksch, Kühne, Chittenden, Thudichum, Koch, Baldi, Brieger, Moriya, Liebreich, Gamgee, Blankenhorn, Ruppel, Konel, Freytag, Wörner, Thierfelder, Gies, Cramer, Posner, Parcus, Müller, Zuelzer, Weisbach, Bünz, Noll. Quantitative Bestimmungen über Ochsen- und Pferdegehirne wurden vor allem ausgeführt durch Petrowsky und Baumstark. Petrowsky führt dabei alle organischen, Phosphor enthaltende Substanzen unter dem Namen Lecithin auf. Daher bieten diese Bestimmungen gewissermaßen nur geringen Nutzen dar. In den Baumstarkschen Bestimmungen, bei denen die graue Hirnsubstanz nicht genügend von der weißen geschieden werden konnte, und wo sie sich daher vorzugsweise bald auf die eine, bald auf die andere beziehen, konnte fast die Hälfte der organischen Substanz — hauptsächlich die in Äther lösliche — nicht eingehend analysiert werden. Aus diesem Grunde geben uns auch diese Untersuchungen kein klares Bild von der quantitativen Zusammensetzung des Gehirns.

Aus den Untersuchungen Kurt Linnerts geht hervor, daß ein großer Teil der Gehirnmasse von Lipoiden gebildet wird, die aus Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Phosphor — selten Schwefel — bestehen. Diese Lipide scheiden sich in drei Gruppen: Cholesterine, mit Wasserstoff gesättigte Lipide und nicht mit Wasserstoff gesättigte, welche letztere sehr veränderlich sind.

Die verschiedenen Arten Lipide können aus der Gehirns substanz extrahiert werden, indem man das vorher getrocknete Gehirn nacheinander mit Aceton, Äther, Petroläther, Benzin und Alkohol behandelt und sie nach dem Verdampfen im Vakuum krystallisieren läßt. Aus den bisher angestellten Untersuchungen geht vor allem die ungleiche Verteilung der organischen Substanzen der weißen und grauen Gehirns substanz hervor.

Meine Untersuchungen betreffen die Gehirns substanz im allgemeinen bei Tieren, die nach einem bestimmten Zeitraum normaler Ernährung, und solcher, die nach einer mehr oder weniger verlängerten Hungerkur getötet worden waren. Bei dieser Abhandlung beschränke ich mich darauf, die vorläufigen Resultate zu geben hinsichtlich der Mengen von Wasser, Cholesterin, Lecithin, neutralem Fett, sowie über den Ätherextrakt und die Eiweißstoffe. Diese Untersuchungen werden dann später weiter ausgeführt werden, und zwar getrennt für die graue und die weiße Hirns substanz. Meine Versuchstiere waren Hunde, die, wie bekannt, den Hunger sehr lange aushalten. Es waren durchaus gesunde Tiere und ihr Gehirn wies bei der mikroskopischen Untersuchung keinerlei Besonderheiten auf.

**Methode.** Nach einem Zeitraum regelmäßiger Ernährung, bzw. vollständiger Enthaltung von festen und flüssigen Nahrungsmitteln wurde das Tier getötet und die Hirnhäute vom Gehirn abgezogen. Die zu einem feinen Brei zerstampfte Gehirnmasse wurde zuerst im Ofen bei 37°, dann sorgfältig im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, teils um sie vom Wasser zu befreien, teils zur Quantitätsbestimmung. Zu letzterem Zwecke wurden einige Gramm abgewogen und so lange getrocknet, bis konstantes Gewicht erzielt war. Ich habe diese Methode anderen — z. B. Behandlung mit Alkohol, Äther, Aceton usw. — vorgezogen, weil man durch sie alle Bestandteile der trockenen Gehirns substanz gleichzeitig und ohne Verluste erhalten kann.

Was den Wassergehalt der Gehirns substanz beim normalen Hunde betrifft, so habe ich stets im Durchschnitt 70 g gefunden. Vergleicht man die Zahl mit der, die man beim Hungertiere erhält, so fällt es sofort auf, daß die Wassermenge beim Hungern zunimmt. — Die Bestimmung des Ätherextrakts geschah mittels des Soxhletschen Apparats, wobei der trockene Gehirnbrei verwendet wurde; im Rückstand wurde der Stickstoff nach Kjeldahl festgestellt. Der größere Teil der Gehirns substanz dient zur Gewichtsbestimmung des Cholesterins, des neutralen Fettes und des Lecithins (nach Hoppe-Seyler). Der feine Gehirnbrei wurde 24 Stunden in kaltem Alkohol digeriert, dann filtriert und bei leichter Wärme auf dem Wasserbad eingedampft. Sowohl der Rückstand nach dem Verdampfen des Alkohols als auch der im Alkohol selbst unlösliche Teil wurden mit kaltem Alkohol wiederholt extrahiert. Aus dem durch Verdampfen erhaltenen Rückstande bestimmt man die Gewichtsmenge des Lecithins durch Bestimmung des Phosphors, die des Cholesterins durch Verseifung der Masse mit alkoholischer Kalilauge, indem der Alkohol verdampft, der Rückstand wieder mit Wasser behandelt und schließlich wiederholt mit Äther extrahiert wird, der nur das Cholesterin löst. In der wässrigen Lösung wurde die Phosphorsäure bestimmt durch Verdampfen und Calcination mittels Salpeter und Soda. Aus der Menge des Phosphors wurde die des Lecithins berechnet.

In den folgenden Tabellen finden sich die Durchschnittszahlen der Verhältnisse der Gehirnbestandteile beim normalen wie beim Hungertiere (1000 Teile Gehirnbrei).

**A.**  
Normaler Hund.  
Erwachsenes Männchen.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Gewicht des Tieres	Gewicht des Gehirns	Wasser	Äther- extrakt	Eiweiß- stoffe	Chole- sterin u. Fett	Leci- thin
kg	g	g	g	g	g	g
6	59	700	130	56,25	180	170

**B.**  
Normaler Hund.  
Erwachsenes Männchen.

I	II	III	IV	V	VI	VII
Gewicht des Hundes	Gewicht des Gehirns	Wasser	Äther- extrakt	Eiweiß- stoffe	Chole- sterin u. Fett	Leci- thin
kg	g	g	g	g	g	g
7	56	700	128	53,12	180	170

**C.**  
Hungertier.  
Erwachsenes Männchen.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Hunger- zeit	Gewicht des Tieres beim Be- ginn des Hungerns	Gewicht des Tieres am Ende d. Hunger- zeit	Ge- wicht des Ge- hirns	Wasser	Äther- extrakt	Ei- weiß- stoffe	Chole- sterin u. Fett	Leci- thin
Tage	kg	kg	g	g	g	g	g	g
30	13	7	70	900	80	55,12	178	171

**D.**  
Hungertier.  
Erwachsenes Männchen.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Hunger- zeit	Gewicht des Tieres beim Be- ginn des Hungerns	Gewicht des Tieres am Ende d. Hunger- zeit	Ge- wicht des Ge- hirns	Wasser	Äther- extrakt	Ei- weiß- stoffe	Chole- sterin u. Fett	Leci- thin
Tage	kg	kg	g	g	g	g	g	g
28	16	10	78	900	79	54,12	176	170

### Zusammenfassung.

Aus meinen Untersuchungen geht hervor:

1. Der Wassergehalt des Gehirns steigt bei Hungertieren.
2. Parallel mit dem Steigen des Wassers vermindert sich der Ätherextrakt.
3. Weitere Versuche müßten feststellen, ob das Steigen des Wassers und die Verminderung des Ätherextrakts progressiv sind, und ob sie in direktem Verhältnis mit einer Verlängerung der Hungerkur stehen.
4. Die Menge der anderen festen Gehirnssubstanzen ist beim normalen und beim Hungertiere ungefähr dieselbe.

### Literatur.

- 1) W. Müller, Über die chem. Bestandteile d. Gehirns. Ann. d. Chem. u. Pharm. 103, 152.
- 2) W. Müller, Über die chem. Bestandteile d. Gehirns. Ann. d. Chem. u. Pharm. 105, 361.
- 3) O. Liebreich, Reaktion u. chem. Bestandt. d. Gehirns. Ann. d. Chem. u. Pharm. 136, 29.
- 4) Petrowski, Zusammensetzung d. grauen u. weißen Substanz d. Gehirns. Arch. f. d. ges. Physiol. 7, 387.
- 5) Chevalier, Zur chem. Untersuchg. d. Nervensubst. Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 340.
- 6) O. Langendorff, Die chem. Reaktion d. grauen Substanz. Biol. Centralbl., 11, 188 bis 191.
- 7) P. Malerba, Sul ricambio del fosforo nell' encefalo. Estratto dal Giorn. Intern. delle Scienze mediche. Anno XXVII.
- 8) A. Panella, L'acido fosfocarnico nella sostanza nervosa centrale. Giorn. della R. Acc. di Medic. di Torino, N. 6, 1903.
- 9) E. Bibra, Vergl. Untersuchungen über d. Gehirn d. Menschen u. d. Säugetiere. Mannheim.
- 10) A. Jacksoh, Über d. Vorkommen von Nuclein im Menschengehirne. Arch. f. d. ges. Physiol. 13, 469.
- 11) A. Ewald u. W. Kuehne, Über einen neuen Bestandt. d. Nervensystems. Verhandl. des naturhist. med. Vereins zu Heidelberg. 1, 457.
- 12) Geoghegan, Über d. anorgan. Gehirnsalze, nebst einer Bestimmung d. Nucleins im Gehirn. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 330, 339.
- 13) A. Gamgee u. E. Blankenhorn, Über Protogon. Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 260, 283.
- 14) E. G. Geoghegan, Über d. Konstitution des Cerebrins. Zeitschr. f. physiol. Chem., 3, 332, 338.
- 15) E. Parcus, Über einige neue Gehirnstoffe. Dissert. Leipzig.

# Die Bildung von organischen Phosphorverbindungen aus anorganischen Phosphaten.

Von  
Gustav Fingerling.

(Aus der Kgl. Württ. Landw. Versuchstation Hohenheim.)

(Eingegangen am 23. Dezember 1911.)

Schon die Beobachtungen Mieschers<sup>1)</sup>, der die Fähigkeit der ins Süßwasser einwandernden Lachse erkannte, ihre Eierstöcke und Hoden auf Kosten des großen Rumpfmuskels zu bilden, gestatteten den Rückschluß, daß auch die im Rumpfmuskel enthaltenen Phosphorverbindungen beim Aufbau der Eier zur Bildung von Lecithin und Nucleinsubstanzen verwendet werden können. Seit dieser Beobachtung wurde durch eine Reihe anderer Feststellungen<sup>2)</sup> sogar die synthetische Bildung der organischen Phosphorverbindungen aus Phosphaten sehr wahrscheinlich gemacht. Ob sich aber im tierischen Körper diese Synthese von organischen Phosphorverbindungen aus anorganischen Phosphaten ebenso leicht und vollkommen vollziehen kann, wie aus organischen Phosphorverbindungen, darüber geben die vorliegenden Untersuchungen meines Erachtens keinen sicheren Aufschluß. Es schien mir daher nicht uninteressant, diese Frage durch dahingehende Versuche experimentell zu studieren.

---

<sup>1)</sup> Die histochem. u. physiol. Arbeiten, Leipzig 1897.

<sup>2)</sup> Wendt, Skandin. Arch. 17, 211. — Holsti, *ibid.* 23, 143. — Hart, McCallum und Fuller, Research Bulletin Nr. 1, Agric. Experim. Station Univ. of Wisconsin 1909. — Gregersen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 49.



### I. Versuche mit Enten.

Ein sehr geeignetes Versuchsmaterial zum Studium dieser Frage ist zweifellos eierlegendes Geflügel, das in den gelegten Eiern große Mengen organischer Phosphorverbindungen, namentlich Lecithin- und Nucleinsubstanzen, absondert. Besitzt der tierische Organismus nun die Fähigkeit, aus anorganischen Phosphaten organische Phosphorverbindungen leicht aufzubauen, so darf durch eine Ernährung der genannten Tierart mit einem an organischen Verbindungen armen, dagegen an Phosphaten reichen Futter die Eierproduktion nicht geschädigt werden; geht ihm diese Fähigkeit aber ab, so steht zu erwarten, daß von den Tieren in Ermangelung des geeigneten Baumaterials weniger oder eventuell überhaupt keine Eier mehr gebildet werden, wie es denn bekannt ist, daß die geringste Störung in der Haltung und Ernährungsweise die Eierproduktion zu schädigen vermag.

Ich wählte daher zu meinen Versuchen sogenannte Laufenten, die schon zu einer Zeit gekauft wurden, zu der sie noch keine Eier legten. 4 Tiere der genannten Art kamen von Mitte November 1909 ab in einen zementierten Stall, der die Gewähr bot, daß die Enten sich ihren Nahrungsbedarf auf keine andere Weise verschaffen konnten, als durch das ihnen gebotene Futter. Die Tiere erhielten nun ca. 300 g gekochte Kartoffeln, 80 g gekochtes Blutalbumin, 300 g verkleisterte Kartoffelstärke, 10 g präzipitierten Futterkalk und 10 g kohlensauen Kalk pro Tag und Kopf. Frisches Wasser wurde den Tieren täglich in ausreichender Menge geboten. Ausschlaggebend für die Wahl dieses Futters war der geringe Gehalt desselben an organischen Phosphorverbindungen. Die in den Kartoffeln und dem Blutalbumin in geringen Mengen enthaltenen Phosphorverbindungen waren durch das Kochen zum Teil noch ausgelaugt worden, so daß die durch diese Futtermittel zugeführte Phosphorsäuremenge nur ca. 0,25 g betrug.

Vom 1. April ab kamen die Tiere in einen mit Sand hoch aufgeschütteten und eingezäunten Platz ins Freie, weil zu befürchten stand, daß die Tiere bei ausschließlicher Stallhaltung überhaupt nicht legen würden, wie dies beispielsweise bei Hühnern oft der Fall ist, die einen freien Auslauf bedürfen.

Als am 21. April 2 Tiere zu legen anfangen, wurden sie mittels Celluloidringen gekennzeichnet und über Nacht in separierte Ställe gebracht. Die Enten legten meistens über Nacht; zur Sicherheit wurden sie aber jeden Morgen, ehe sie ins Freie kamen, daraufhin untersucht, ob das baldige Legen eines Eies zu erwarten war. In diesem Falle blieben die Enten in ihren Einzelställen, bis das gebildete Ei gelegt war.

Die gelegten Eier eines jeden Tieres wurden nun getrennt gewogen, ihr Inhalt möglichst bald zur Bestimmung des Lecithin-gehaltes in Alkohol geschlagen, mit Alkohol und Äther in der Wärme erschöpft, das lecithinhaltige Extrakt nach Neumann mittels eines Gemisches von konzentrierter Schwefelsäure und Salpetersäure verascht, und die Phosphorsäure nach Lorenz bestimmt. Der mit Alkohol und Äther erschöpfte Rückstand von 10 Tagen wurde gesammelt, gründlich gemischt, ein aliquoter Teil nach Neumann verascht und der Phosphorsäuregehalt nach Lorenz ermittelt. Zwar schließt die auf diese Weise gefundene Phosphorsäuremenge auch Phosphorsäure ein, die eventuell anorganischer Natur ist. Da es aber gegenwärtig kein sicheres Verfahren gibt, das die quantitative Trennung der anorganischen Phosphorverbindungen von den organischen erlaubt, so war eine Trennung leider nicht durchzuführen<sup>1)</sup>. In Anbetracht des Umstandes jedoch, daß die Eier nur wenig anorganische Phosphate enthalten können, habe ich sie vernachlässigt und die im Rückstand enthaltenen Phosphorverbindungen zu den Nucleinen gerechnet.

Die Lebendgewichtsfeststellung erfolgte in 8 bis 12tägigen Intervallen.

Mitte Juli fingen die Tiere an zu brüten und legten in den nächsten 3 Wochen keine Eier mehr. Da wir die Eier zur

---

<sup>1)</sup> Da das Ovovitellin in Salzsäure von 1<sup>0</sup>/<sub>00</sub> HCl schon löslich ist, ließ auch das Schulze-Stutzersche Trennungsverfahren im Stich. Im übrigen kann die in den Eiern enthaltene Phosphorsäuremenge anorganischer Natur nur sehr klein sein; extrahiert man nämlich die Eier längere Zeit mit Alkohol und Äther und unterwirft den Rückstand dem Trennungsverfahren von Schulze-Stutzer, so kommen nur geringe Phosphorsäuremengen zur Wägung, die zum größten Teil organischer Bindung sind, denn es gelingt bekanntlich sehr schwer, dem Ovovitellin mit Alkohol und Äther das Lecithin zu entziehen.

Untersuchung verwandten, legten wir den Enten keine Eier unter. Leider kam uns erst nachträglich die Idee, Eier bebrüten zu lassen, um auf diese Weise festzustellen, ob sich aus den Eiern, die bei der erwähnten Fütterungsweise gelegt worden waren, normale Junge entwickeln würden<sup>1)</sup>.

Die im Anhang befindlichen Tabellen enthalten nun die näheren Angaben über Lebendgewichtsveränderungen der Tiere, Gewicht der Eier und die bei ihrer Untersuchung erhaltenen Ergebnisse.

Wie aus diesen Zahlen hervorgeht, hat das Lebendgewicht der Enten während der Dauer des Versuchs stetig zugenommen; die Lebendgewichtszunahme beträgt bei

Ente Nr. 1 . . .	0,495 kg,
„ „ 2 . . .	0,640 „
„ „ 3 . . .	0,460 „
„ „ 4 . . .	0,335 „

Auch die Eierproduktion war eine der Haltungsart entsprechend normale. Es wurden gelegt von

Ente Nr. 1 . . .	138 Eier <sup>2)</sup>	in 192 Tagen,
„ „ 2 . . .	115 „	„ 175 „
„ „ 3 . . .	102 „	„ 162 „
„ „ 4 <sup>3)</sup> . . .	70 „	„ 85 „

J. König<sup>4)</sup> gibt zwar an, daß Enten bis zu 220 bis 250 Eier zu legen pflegen. Da aber die Zahl der Eier von der Individualität, Rasse, der Haltungsart und dem Alter der Tiere abhängig ist, so lassen sich Normen in dieser Beziehung nur bedingt aufstellen. Wenn die Zahl der von meinen Versuchsenten gelegten Eier wesentlich unter der von König

<sup>1)</sup> Diese Versuche sind für den kommenden Sommer eingeleitet.

<sup>2)</sup> Außer den in den Tabellen angegebenen und untersuchten Eiern wurden noch von der Ente Nr. 1 32, von der Ente Nr. 2 18, und von der Ente Nr. 3 15 Eier gelegt, die ich aber aus Mangel an Zeit nicht sofort verarbeiten konnte. Als ich später diese Eier zur Untersuchung vorbereiten wollte, waren sie schon teilweise in Zersetzung übergegangen. Ich sah daher von einer Untersuchung derselben ab und lege für diese Eier die mittlere Zusammensetzung aller in dieser Periode untersuchten Eier zugrunde.

<sup>3)</sup> Ente Nr. 4 starb am 24. August infolge Eiverhaltung; daher ist die Zahl der gelegten Eier geringer.

<sup>4)</sup> J. König, Die menschlichen Nahrungs- und Genußmittel 2, 20.

angegebenen Menge geblieben ist, so dürfte dies in erster Linie dem Umstand zuzuschreiben sein, daß den Tieren kein größeres Wasserbassin zur Verfügung stand, ein für das Wohlbefinden der Enten unbedingtes Erfordernis.

Ferner zeigen die Zahlen der Tabellen, daß von den Enten beträchtliche Mengen Lecithin gebildet worden sind, trotzdem der Gehalt des Futters an Lecithin oder anderen organischen Phosphorverbindungen den Bedarf der Tiere nicht zu decken vermochte; und zwar von

Ente Nr. 1	27,63 g	$P_2O_5$ ,	entsprechend	302,3 g	Lecithin
„ „ 2	22,48 g	„	„	246,0 g	„
„ „ 3	19,44 g	„	„	212,7 g	„
„ „ 4	11,83 g	„	„	129,4 g	„

Auch Nucleinsubstanzen sind in größerem Umfange gebildet worden, denn es wurden von Ente Nr. 1 21,41 g, von Ente Nr. 2 18,13 g, von Ente Nr. 3 14,00 g und von Ente Nr. 4 9,67 g Phosphorsäure zur Bildung dieser Stoffe verwandt.

Woher haben nun die Enten das Baumaterial zur Bildung dieser Lecithin- und Nucleinsubstanzmengen genommen? Aus dem Vorrat des eigenen Körpers?

Daß dies nicht möglich ist, geht einmal aus dem Umstand hervor, daß die Tiere 5 Monate vor Beginn der Versuche nur mit anorganischen Phosphaten ernährt wurden. In dieser langen Zeit wäre zweifellos angesichts der ständigen Zersetzung und Ausscheidung von lecithinartigen Verbindungen durch den Kot ein großer Teil des im Organismus vorhandenen Lecithins aufgebraucht worden; dann ist aber auch die in den Eiern ausgeschiedene Lecithinmenge zu groß, als daß der Organismus soviel von dieser Substanz enthalten konnte, denn sie beträgt in Prozenten des Lebendgewichtes bei

Ente Nr. 1	. . .	17,24
„ „ 2	. . .	10,67
„ „ 3	. . .	12,93
„ „ 4	. . .	6,02

Ferner könnte man die Quelle für die Phosphorsäureversorgung in den Nucleinverbindungen des Körpers, die für den gedachten Zweck abgebaut würden, suchen. Wäre diese Annahme begründet, so hätten bedeutende Mengen nuclein-

haltigen Körpermaterials zum Einschmelzen gebracht werden und die Tiere mithin bei der langen Dauer des Versuchs stark abmagern müssen. Da dies nicht der Fall gewesen ist, im Gegenteil eine stetige Lebendgewichtszunahme, wie schon dargestellt, zu verzeichnen war, so kann auch dieser Erklärungsversuch nicht anerkannt werden.

Es bleibt mithin keine andere Erklärungsmöglichkeit als die synthetische Bildung dieser großen Mengen von Lecithin- und Nucleinsubstanzen aus den verfütterten anorganischen Phosphaten übrig.

Um nun zu prüfen, ob Enten aus anorganischen Phosphaten in demselben Umfang Lecithin- und Nucleinsubstanzen zu bilden vermögen, wie aus organischen Phosphorverbindungen, beschloß ich, die Eierproduktion der Enten bei einer Fütterung zu verfolgen, die organische Phosphorverbindungen in genügender Menge enthielt. Die Tiere erhielten daher während des folgenden Winters eine Nahrung, die reich an organischen Phosphorverbindungen war (Kleie, Getreideschrot, Sesamkuchen usw.). Als sie im Frühjahr mit dem Legen wieder anfangen, gaben wir ihnen freien Auslauf, damit sie sich ihre Nahrung selbst suchen konnten; dazu stand ihnen in reichlichem Maße ein an organischen Phosphorverbindungen reiches Futter zu Gebote (junges Gras, Getreideschrot, Sesamkuchen, Kleie usw.). Die bei dieser Haltungs- und Ernährungsweise gelegten Eier wurden wie im ersten Versuch gesammelt, gewogen und untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungen enthalten die in der Anlage befindlichen Tabellen.

Wie die Notierungen dieser Tabellen dartun, hat das Lebendgewicht der Enten auch bei der naturgemäßerer Ernährungsweise nicht mehr zugenommen, als wir dies bei den Versuchen des Jahres 1910 konstatieren konnten. Die Lebendgewichtszunahme beträgt nämlich bei

Ente Nr. 1 . .	0,460 kg	gegenüber	0,495 kg	im Jahre	vorher,
„ „ 2 . .	0,690 kg	„	0,640 kg	„	„
„ „ 3 . .	0,490 kg	„	0,460 kg	„	„

Auch die Eierproduktion hielt sich ungefähr in den Grenzen des Jahres vorher; es wurden gelegt:

von Ente Nr. 1 . .	117 Eier <sup>1)</sup>	in 173 Tagen,
„ „ „ 2 . .	97 „ „	160 „
„ „ „ 3 . .	107 „ „	153 „

Wie aus diesen Zahlen hervorgeht, wurde auch in diesem Jahre bei der naturgemäßerer Haltung und Fütterung der Enten die Zahl von Eiern nicht erreicht, die König angibt. Die geringere Zahl der gelegten Eier ist mithin nicht durch die Fütterungsart hervorgerufen, sondern durch die Individualität, Rasse usw. bedingt.

An Lecithinverbindungen wurden durch die gelegten Eier abgeschieden:

von Ente Nr. 1 . .	23,12 g $P_2O_5$ ,	entsprechend 253,0 g Lecithin,
„ „ „ 2 . .	18,85 g $P_2O_5$ ,	„ 206,2 g „
„ „ „ 3 . .	20,51 g $P_2O_5$ ,	„ 224,4 g „

An Nucleinphosphorsäure wurden folgende Mengen durch die Eier abgeschieden:

von Ente Nr. 1 . .	17,50 g $P_2O_5$ ,
„ „ „ 2 . .	15,01 g $P_2O_5$ ,
„ „ „ 3 . .	14,60 g $P_2O_5$ .

Vergleichen wir nun zwecks Prüfung der Frage, ob die Enten aus anorganischen Phosphaten in demselben Umfange Lecithin- und Nucleinsubstanzen zu bilden vermochten wie aus organischen Phosphorverbindungen, die in den beiden Jahren erhaltenen Ergebnisse miteinander, so läßt sich folgendes konstatieren.

### 1. Die Eiermenge.

Von den drei in Frage kommenden Enten wurden gelegt:

	Ente Nr. 1	Ente Nr. 2	Ente Nr. 3
Bei Fütterung mit anorg. $P_2O_5$ . .	138 Eier	115 Eier	102 Eier
„ „ „ org. P-Verbind. . . . .	117 „	97 „	107 „
<hr/>			
Bei Fütterung mit org. P-Verbind.			
+ oder -: . . . . .	- 21 Eier	- 18 Eier	+ 5 Eier

<sup>1)</sup> Auch in diesem Jahre konnten leider aus Mangel an Zeit die im Herbst gelegten Eier nicht untersucht werden. So blieben von Ente Nr. 1 20 Stück, von Nr. 2 10 Stück und von Nr. 3 10 Stück ununtersucht. Wir legen daher auch für diese Eier das Mittel aller Untersuchungsergebnisse der Berechnung zugrunde.

Es hat mithin die an organischen P-Verbindungen reiche Fütterung die Zahl der Eier nicht zu vermehren vermocht.

2. Mittleres Gewicht der Eier.

	Ente Nr. 1	Ente Nr. 2	Ente Nr. 3
Bei Fütterung mit anorg. $P_2O_5$ . .	67,8 g	65,8 g	65,2 g
„ „ „ org. P-Verbind.	68,1 g	67,5 g	66,0 g
<hr/>			
Bei Fütterung mit org. P-Verbind.			
+ oder -: . . . . .	+ 0,3 g	+ 1,7 g	+ 0,8 g

Auch in dieser Beziehung sind die Unterschiede, wie diese Gegenüberstellung zeigt, sehr gering.

Berücksichtigt man ferner die Zeit, in der die Eier in den beiden Jahren gelegt wurden, und berechnet das Gewicht der Eier unter der Annahme, daß täglich 1 Ei gelegt worden sei, so ergeben sich folgende Zahlen:

	Ente Nr. 1	Ente Nr. 2	Ente Nr. 3
Bei Fütterung mit anorg. Phosphaten	55,7 g	54,5 g	49,7 g
„ „ „ org. P-Verbind. .	55,1 g	52,4 g	54,7 g
<hr/>			
Org. P-Verbind. + oder - als anorg. Phosphate . . . . .	- 0,6 g	- 2,1 g	+ 5,0 g

Nur bei Ente Nr. 3 betrug das auf den Tag berechnete Eigewicht bei Verfütterung von organischen Phosphorverbindungen etwas mehr als bei Verabfolgung anorganischer Phosphate. Bei den beiden anderen Tieren ist der Unterschied teils zugunsten der Phosphatfütterung, teils ist er minimal. Die aufgetretenen Unterschiede dürften aber, besonders bei Ente Nr. 3, auf Rechnung der individuellen Veranlagung der Tiere zu setzen sein.

3. Mittlerer Gehalt der Eier an Lecithinphosphorsäure

	Ente Nr. 1	Ente Nr. 2	Ente Nr. 3
Bei anorg. $P_2O_5$ -Fütterung . . . .	0,2002 g	0,1955 g	0,1906 g
Bei org. P-Verbind. . . . .	0,1976 g	0,1943 g	0,1917 g
<hr/>			
Bei Fütterung mit org. P-Verbind.			
+ oder -: . . . . .	- 0,0026 g	- 0,0011 g	+ 0,0011 g

## 4. Mittlerer Gehalt der Eier an Nucleinphosphorsäure.

	Ente Nr. 1	Ente Nr. 2	Ente Nr. 3
Bei Fütterung mit anorg. $P_2O_5$ . .	0,1552 g	0,1577 g	0,1373 g
„ „ „ org. P-Verbind.	0,1496 g	0,1548 g	0,1365 g
Bei org. P-Verbind. + oder -: . .	-0,0056 g	-0,0029 g	-0,0008 g

## 5. Die durch die Eier zur Ausscheidung gekommene Lecithinphosphorsäuremenge.

	Ente Nr. 1	Ente Nr. 2	Ente Nr. 3
Bei Fütterung mit anorg. $P_2O_5$ . .	27,63 g	22,48 g	19,44 g
„ „ „ org. P-Verbind.	23,12 g	18,85 g	20,51 g
Bei org. P-Verb. + oder -: . . .	-4,51 g	-3,63 g	+1,07 g

## 6. Die durch die Eier zur Ausscheidung gekommene Lecithinmenge.

	Ente Nr. 1	Ente Nr. 2	Ente Nr. 3
Bei Fütterung mit anorg. $P_2O_5$ . .	302,3 g	246,0 g	212,7 g
„ „ „ org. P-Verbind.	253,0 g	206,2 g	224,4 g
Bei org. P-Verbind. + oder -: . .	-49,3 g	-39,8 g	+11,7 g

## 7. Die durch die Eier zur Ausscheidung gekommene Nucleinphosphorsäuremenge.

	Ente Nr. 1	Ente Nr. 2	Ente Nr. 3
Bei Fütterung mit anorg. $P_2O_5$ . .	21,41 g	18,13 g	14,00 g
„ „ „ org. P-Verbind.	17,50 g	15,01 g	14,60 g
Bei org. P-Verbind. + oder -: . .	-3,91 g	-3,12 g	+0,60 g

Die unter 3. bis 7. vorgeführten Daten lassen keinen Zweifel bestehen, daß von Enten aus anorganischen Phosphaten ebenso leicht und in demselben Umfang Lecithin- und Nucleinsubstanzen gebildet werden können wie aus organischen Phosphorverbindungen, denn sowohl der mittlere Gehalt der Eier an Lecithin- und Nucleinphosphorsäure war nahezu bei beiden Fütterungsarten derselbe, als auch die während des jeweiligen ganzen Versuches durch die Eier zur Ausscheidung gekommene Lecithin- und Nucleinphosphorsäuremenge; diese war bei der Fütterungsweise mit anorganischen Phosphaten eher größer als bei Verabfolgung organischer Phosphorverbindungen. Der tierische Organismus besitzt mithin die Fähigkeit, seinen zur Bildung von Lecithin- und Nucleinsubstanzen nötigen Bedarf an Phosphorsäure ebenso leicht und vollkommen aus



anorganischen Phosphaten wie aus organischen Phosphorverbindungen decken zu können.

#### Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Meine Versuche zeigen, in Bestätigung der Gregersenschen Ergebnisse, daß der tierische Organismus befähigt ist, nicht nur aus abgebauten organischen Phosphorverbindungen — wie dies aus den Miescherschen Forschungen und den Beobachtungen anderer hervorgeht — synthetisch Lecithin- und Nucleinsubstanzen zu bilden, sondern auch aus anorganischen Phosphaten.

2. Dieser Aufbau geschieht offenbar ebenso leicht und vollkommen, wenn dem tierischen Organismus die zur Deckung des Phosphorbedarfs nötige Phosphorsäure lediglich in Form von anorganischen Phosphaten zur Verfügung steht, als wenn organische Phosphorverbindungen geboten werden. Diese Versuche bilden daher ein weiteres Glied in der Kette von Beweisen, daß die Phosphorversorgung des tierischen Organismus mit Hilfe von anorganischen Phosphaten vollkommen erreichbar ist. Sie zeigen aber auch, in welcher umfassender Weise die tierische Zelle unter Benutzung einfacher anorganischer Bausteine kompliziert zusammengesetzte organische Körper wie Lecithin- und Nucleinverbindungen mit leichter Mühe aufzubauen vermag. Diese synthetische Bildung von Lecithin- und Nucleinverbindungen reiht sich den bisher bekannten synthetischen Prozessen, die sich im tierischen Organismus in größerem Umfang vollziehen als man früher anzunehmen geneigt war, würdig an als ein weiteres Beispiel dafür, daß nicht nur der pflanzlichen, sondern auch der tierischen Zelle eine gewaltige synthetische Kraft innewohnt.

In einer weiteren Arbeit hoffen wir zeigen zu können, daß der geschilderte synthetische Aufbau organischer Phosphorverbindungen nicht nur für die Zwecke der Erhaltung der Art, sondern auch für die der Unterhaltung der Lebensvorgänge ebenso vollkommen aus anorganischen Phosphaten stattfinden kann wie aus organischen Phosphorverbindungen.

## Anhang.

Datum 1910	Ente Nr. 1				Ente Nr. 2			
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g
21. IV.	1,505	63,4	0,1829	1,385	1,985	59,5	0,1895	1,463
22. "		69,6	0,1727		59,9	0,1611		
23. "		63,0	0,1539		60,2	0,1796		
24. "		70,5	0,1877		—	—		
25. "		—	—		59,2	0,1684		
26. "		63,0	0,1608		57,0	0,1476		
27. "		69,8	0,1829		57,5	0,1929		
28. "	1,515	56,0	0,1771		2,005	58,5	0,2037	
29. "		55,0	0,1700		59,6	0,1938		
30. "		61,4	0,1557		57,5	0,1862		
1. V.		72,4	0,1969	—	—			
2. "		65,8	0,1977	69,0	0,1847			
3. "		58,7	0,1888	53,0	0,1651			
4. "		—	—	59,3	0,1680			
5. "	1,530	70,8	0,1989	2,045	68,4	0,1895		
6. "		62,5	0,1524	69,9	0,1985			
7. "		62,0	0,1420	75,2	0,2051			
8. "		69,2	0,2012	64,7	0,1835			
9. "		73,1	0,2052	61,8	0,1623			
10. "		61,7	0,1657	65,8	0,1896			
11. "		65,7	0,1900	—	—			
12. "		—	—	72,5	0,2023			
13. "		70,9	0,1980	67,5	0,1953			
14. "	1,540	63,7	0,1816	2,080	69,2	0,2041		
15. "		72,5	0,2060	69,7	0,1969			
16. "		70,0	0,2035	—	—			
17. "		61,4	0,1763	69,3	0,1952			
18. "		68,2	0,1948	73,6	0,2072			
19. "		72,8	0,2052	70,1	0,1990			
20. "	1,425	61,8	0,1740	2,205	—			
21. "		71,2	0,2028	69,4	0,1989			
22. "		—	—	73,5	0,2051			
23. "		75,9	0,2101	68,1	0,1990			
24. "		63,8	0,1882	67,0	0,1887			
25. "		65,9	0,1915	61,0	0,1869			
26. "		70,2	0,2033	72,4	0,2050			
27. "		63,4	0,1920	61,8	0,1826			
28. "	1,550	—	—	2,190	—			
29. "		73,4	0,2066	76,2	0,2092			
30. "		70,1	0,2073	66,7	0,1942			
31. "		62,5	0,1951	—	—			
1. VI.		66,8	0,1829	72,5	0,2056			
2. "		64,9	0,1925	59,7	0,1796			
3. "		67,1	0,1903	65,3	0,1957			
4. "		75,0	0,2099	69,0	0,1961			
5. "	1,560	—	—	71,4	0,2104			
6. "		68,5	0,2017	—	—			
7. "		64,6	0,1958	72,2	0,2094			
8. "		63,0	0,1948	67,3	0,2015			
9. "		—	—	65,6	0,1969			

Datum 1910	Ente Nr. 1				Ente Nr. 2				
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>3</sub> O <sub>5</sub> g	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>3</sub> O <sub>5</sub> g	
10. VI.		78,0	0,2122	} 1,484		63,4	0,1873	} 1,588	
11. "		63,4	0,1948				68,5		0,2002
12. "		66,9	0,2065				68,0		0,2117
13. "		68,5	0,2132				69,1		0,2119
14. "		60,0	0,1907			—	—		
15. "	1,570	—	—		2,245	74,8	0,2101		
16. "		73,7	0,2139			63,8	0,1901		
17. "		65,9	0,1961			69,8	0,2000		
18. "		68,4	0,2027			63,8	0,1958		
19. "		61,3	0,1885			67,6	0,2000		
20. "		64,5	0,1981			69,4	0,2040		
21. "		67,7	0,1961			61,4	0,1792		
22. "		65,0	0,2015			60,1	0,1796		
23. "	1,620	60,4	0,1822	} 1,527	2,285	63,8	0,1878	} 1,624	
24. "		61,8	0,1837				70,0		0,2106
25. "		65,0	0,2030				61,2		0,1891
26. "		—	—				—		—
27. "		75,8	0,2117			76,3	0,2139		
28. "		61,4	0,1862			68,8	0,2119		
29. "		69,9	0,2126			64,4	0,1939		
30. "		—	—			64,0	0,1936		
1. VII.		73,2	0,2145			69,4	0,2135		
2. "		67,7	0,2027			64,0	0,1931		
3. "	1,665	61,9	0,1885		2,335	69,0	0,2116		
4. "		69,0	0,2142	} 1,553		—	—		
5. "		65,3	0,1970				71,0	0,2132	
6. "		60,4	0,1885				64,1	0,1895	
7. "		—	—				—	—	
8. "		—	—			—	—		
9. "		69,2	0,2136			63,5	0,1901		
10. "		65,3	0,2035			68,8	0,2129		
11. "		68,4	0,2135			70,1	0,2172		
12. "	1,695	65,0	0,2094		2,345	—	—		
13. "		68,2	0,2120			70,8	0,2191		
14. "		72,8	0,2155			71,3	0,2134		
15. "		65,1	0,2079	} 0,948		61,0	0,1938	} 0,790	
16. "		—	—				—		—
17. "		—	—				—		—
18. "		—	—				—		—
19. "		70,8	0,2139			—	—		
20. "	1,775	—	—		2,390	65,8	0,2101		
14. VIII.		70,8	0,2139			68,9	0,2101		
15. "	1,975	71,5	0,2152		2,595	73,5	0,2177		
16. "		68,9	0,2066			69,5	0,2086		
17. "		74,2	} 0,4430			70,5	} 0,4304		
18. "		—						73,5	
19. "		75,0					—	1,650	

Datum 1910	Ente Nr. 1				Ente Nr. 2													
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g										
20. VIII.	1,970	71,2	} 0,4246	} 1,631	2,570	69,5	} 0,4284	} 1,977										
21. "		68,5				70,5												
22. "		71,5	} 0,4298			70,8	} 0,4244											
23. "		73,0				69,5												
24. "		—	} 0,4334			71,5	} 0,4328											
25. "		69,4				—												
26. "		73,5	} 0,4310			70,8	} 0,4390											
27. "		67,0				74,5												
28. "		71,5	} 0,4284			69,5	} 0,4258											
29. "		65,5				68,5												
30. "		74,5	} 0,4264			—	} 0,4274											
31. "		67,0				69,5												
1. IX.	2,005	—	} 1,671	66,5	} 0,4214	} 1,977												
2. "		71,5		69,0														
3. "		68,8		} 0,4234			70,2	} 0,4214										
4. "		73,2					—											
5. "		75,0		} 0,4410			68,5	} 0,4063										
6. "		70,8					64,5											
7. "		69,5		} 0,4234			66,0	} 0,2129										
8. "		72,8					70,5											
9. "		—		} 1,879			} 1,879	} 1,879										
10. "		—																
11. "		69,5							} 0,4242	} 1,879	} 1,879							
12. "		65,9										—						
13. "	—	} 0,4246	} 1,879		} 1,879													
14. "	67,8					—												
15. "	71,2	} 0,4292				} 1,879			} 1,879									
16. "	70,0											—						
17. "	68,2	} 0,4258										} 1,879	} 1,879					
18. "	—													—				
19. "	67,5	} 0,4258												} 1,879	} 1,879			
20. "	72,0															—		
Mittel	1,681	67,8		0,2002			0,1552	2,274								65,8	0,1955	0,1577

Datum 1910	Ente Nr. 3				Ente Nr. 4			
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g
25. IV.	1,425	62,4	0,1403	} 1,255	1,955	61,5	0,1575	} 1,473
26. "		68,5	0,1755					
27. "		75,0	0,1898					
28. "		63,0	0,1534					
29. "		64,9	0,1839					
30. "		—	—					
1. V.	68,1	0,1971	} 1,255	} 1,255	59,5	0,1473	} 1,473	
2. "	74,9	0,1875						—

Datum 1910	Ente Nr. 3				Ente Nr. 4				
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	
3. V.		63,7	0,1733	}		60,5	0,1442	} 1,247	
4. "		61,1	0,1639				60,0		0,1529
5. "	1,430	65,2	0,1969			1,965	51,5		0,1458
6. "		—	—				58,8		0,1516
7. "		65,3	0,1727				57,7		0,1672
8. "		66,3	0,1840				—		—
9. "		—	—				69,8		0,1919
10. "		—	—				52,6		0,1516
11. "		68,1	0,1862				53,3		0,1532
12. "		65,0	0,1875		} 1,304		58,2		0,1618
13. "		61,8	0,1722				53,9	0,1648	
14. "	1,445	62,7	0,1845			1,970	52,1	0,1552	
15. "		—	—				—	—	
16. "		76,0	0,2023				57,1	0,1771	
17. "		57,5	0,1656				59,7	0,1717	
18. "		68,8	0,1920				52,4	0,1475	
19. "		63,3	0,1750				54,6	0,1635	
20. "	1,332	65,1	0,1875			2,092	55,8	0,1707	
21. "		62,7	0,1700				59,3	0,1812	
22. "		68,7	0,1901	} 1,267		54,4	0,1555	} 1,346	
23. "		69,0	0,1999				52,3		0,1560
24. "		—	—				55,7		0,1651
25. "		65,4	0,1743				—		—
26. "		70,0	0,2017				62,7		0,1863
27. "		65,9	0,1890				58,1		0,1671
28. "	1,455	62,1	0,1765			2,100	54,9		0,1773
29. "		68,5	0,1895				—		—
30. "		64,3	0,1951				68,5		0,1931
31. "		69,4	0,2017				53,6		0,1638
1. VI.		63,7	0,1911	} 1,403		56,1	0,1664	} 1,388	
2. "		62,8	0,1858				55,0		0,1633
3. "		—	—				58,4		0,1656
4. "		63,9	0,1885				—		—
5. "	1,460	60,2	0,1664			2,100	51,6		0,1516
6. "		63,3	0,1870				54,7		0,1628
7. "		—	—				58,3		0,1682
8. "		—	—				56,2		0,1628
9. "		72,7	0,2092				53,1		0,1633
10. "		65,9	0,1919				50,2		0,1602
11. "		61,3	0,1882	} 1,404		55,8	0,1631	} 1,402	
12. "		61,4	0,1743				59,0		0,1766
13. "		—	—				—		—
14. "		65,4	0,1937				55,8		0,1812
15. "	1,470	67,5	0,1925			2,090	57,3		0,1829
16. "		60,4	0,1774				50,2		0,1425
17. "		—	—				—		—
18. "		67,0	0,1994				58,1		0,1865
19. "		63,3	0,1928				51,9		0,1602
20. "		70,2	0,2099				63,8		0,1770
21. "		62,8	0,1837			60,2	0,1771		

Datum 1910	Ente Nr. 3				Ente Nr. 4				
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	
22. VI.		65,1	0,1974	1,394	2,150	62,0	0,1780	1,441	
23. "	1,530	61,1	0,1812				—		—
24. "		68,0	0,2050				64,1		0,1850
25. "		64,5	0,1961				53,6		0,1806
26. "		60,1	0,1821				55,7		0,1664
27. "		61,8	0,1864				59,0		0,1898
28. "		64,7	0,1969				55,5		0,1770
29. "		—	—				59,2		0,1885
30. "		60,4	0,1804				51,2		0,1651
1. VII.		68,7	0,2056				—		—
2. "		60,9	0,1898		2,180	63,7	0,1865	1,503	
3. "	1,570	68,2	0,2058			58,7	0,1865		
4. "		—	—			50,8	0,1783		
5. "		63,2	0,1875			56,6	0,1799		
6. "		67,0	0,2079			59,3	0,1938		
7. "		—	—			—	—		
8. "		68,7	0,2135			61,0	0,1796		
9. "		60,4	0,1724			—	—		
10. "		—	—			59,0	0,1722		
11. "		68,5	0,2122			52,4	0,1684		
12. "	1,605	—	—		2,225	—	—		
13. "		68,3	0,2122	1,327		61,7	0,1845	1,503	
14. "		70,2	0,2086				63,4		0,1859
15. "		62,8	0,1929				54,7		0,1819
16. "		58,6	0,1730				50,0		0,1590
17. "		59,9	0,1816				—		—
18. "		—	—				—		—
19. "		—	—				53,1		0,1628
20. "	1,600	63,4	0,1826			2,260	—		—
21. "		—	—				58,2		0,1816
22. "		—	—				59,4		0,1842
Brutperiode: 23. VII.—15. VIII.					Brutperiode: 23. VII.—21. VIII. Am 24. VIII. verendete das Tier an Eiverhaltung.				
14. VIII.		—	—	1,425	2,099	57,3	0,1690	0,1382	
15. "	1,850	—	—						
16. "		65,5	0,2071						
17. "		68,7	0,2024						
18. "		68,2	0,4130						
19. "		65,0	—						
20. "		—	—						
21. "		63,8	0,3882						
22. "		67,2	0,4192						
23. "		65,5	—						
24. "		62,5	0,4202						
25. "		—	—						
26. "		64,5	—						
27. "	1,825	69,5	—						
28. "		—	—						
29. "		63,8	0,4056						
30. "		67,5	—						

Datum 1910	Ente Nr. 3				Ente Nr. 4			
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g
31. VIII.		63,0	} 0,3896	} 1,167				
1. IX.		61,5						
2. "		—						
3. "		—						
4. "		66,5	} 0,3914					
5. "		63,5						
6. "		61,5	} 0,3862					
7. "	1,865	62,5						
Mittel	1,561	65,2	0,1906	1,1373				

Datum 1911	Ente Nr. 1				Ente Nr. 2						
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g			
5. IV.	2,250	64,2	0,1964	} 1,300	2,750	—	—	} 1,416			
6. "		66,0	0,1852								
7. "		68,5	0,1895								
8. "		70,0	0,2066								
9. "		63,5	0,1911								
10. "		71,5	0,1985								
11. "		—	—								
12. "		62,5	0,1789								
13. "		64,0	0,1776								
14. "		69,4	0,2048								
15. "		70,2	0,2040								
16. "		69,8	0,1935								
17. "		61,4	0,1895								
18. "		69,2	0,2086								
19. "		2,260	73,0			0,2072					
20. "			—			—					
21. "			70,6			0,2038	} 1,517		2,830	71,2	0,2062
22. "			65,2			0,1821					
23. "			66,8			0,1985					
24. "	—		—								
25. "	65,0		0,1733								
26. "	67,5		0,1858								
27. "	68,8		0,1782								
28. "	60,5		0,1608								
29. "	64,0	0,1664									
30. "	—	—									
1. V.		71,2	0,1981	} 1,387		66,6	0,1824	} 1,476			
2. "		63,7	0,1674								
3. "		—	—								
4. "		65,8	0,1865								
5. "		70,2	0,2008								

Datum 1911	Ente Nr. 1				Ente Nr. 2			
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g
6. V.		67,2	0,1932			63,0	0,1748	
7. "		66,9	0,1862			61,4	0,1684	
8. "		69,2	0,2020			64,8	0,1898	1,482
9. "		65,4	0,1931			66,3	0,1898	
10. "	2,280	71,8	0,1990		2,940	—	—	
11. "		—	—			70,9	0,2033	
12. "		64,2	0,1865			68,0	0,2013	
13. "		69,1	0,2063			61,8	0,1773	
14. "		63,6	0,1931			66,0	0,1997	
15. "		74,3	0,2089	1,474		62,7	0,1849	
16. "		65,4	0,4010				61,8	0,3334
17. "		67,9					59,0	
18. "		72,5	0,4146			60,4	0,1782	
19. "		71,3					—	—
20. "		—	—			—	—	
21. "		68,4	0,1994			78,0	0,2112	1,527
22. "		73,6	0,2130			70,2	0,2046	
23. "		66,9	0,1937			65,5	0,1885	
24. "	2,295	60,8	0,1737		3,010	63,8	0,1766	
25. "		73,3	0,2089			—	—	
26. "		—	—			72,4	0,2062	
27. "		74,2	0,2099	1,510		67,3	0,1934	
28. "		65,8	0,1934				69,2	0,2060
29. "		69,9	0,2096			69,9	0,2096	
30. "		—	—			—	—	
31. "		72,5	0,2040			73,0	0,2065	
1. VI.		73,8	0,4162			74,2	0,4224	
2. "		67,7						—
3. "		63,9	0,1994			73,8	0,1941	1,525
4. "		—	—			65,2		
5. "		73,9	0,4132			61,9	0,3684	
6. "		70,4						63,8
7. "	2,350	63,2	0,3664		3,100	65,7	0,4126	
8. "		60,4						—
9. "		61,8	0,3916	1,502		70,5	0,4000	
10. "		68,8						
11. "		71,0	0,4034			66,0	0,4086	
12. "		70,0						—
13. "		—	—			73,5	0,3968	
14. "		71,0	0,3802			67,3		
15. "		63,5					68,8	0,3968
16. "		64,2	0,3856			66,0	0,4086	
17. "		66,7						—
18. "		—	—			74,0	0,2112	
19. "		70,0	0,1993			—	—	
20. "		69,2	0,2013			76,0	0,2155	
21. "	2,395	65,7	0,1888	1,535	3,185	73,4	0,2102	
22. "		—	—				—	—
23. "		67,8	0,2078			74,3	0,2109	
24. "		69,0	0,2018			68,7	0,1972	



Datum 1911	Ente Nr. 1				Ente Nr. 2				
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	
25. VI.		—	—			—	—		
26. "		—	—			63,5	—		
27. "		65,5	0,2063			—	0,3760		
28. "		—	—			64,9	—		
29. "		71,4	0,4216			67,8	0,2060		
30. "		73,5				—	—	—	
1. VII.		74,2	0,4240			75,9	0,4280	1,600	
2. "		—				—			—
3. "		68,1	0,4092	1,402	3,260	76,0	—		
4. "		66,5						—	—
5. "	2,465	69,0	0,4222			74,0	0,4300		
6. "		73,0				70,2	—		
7. "		68,7	0,2114			67,1	0,3858		
8. "		67,2				63,5	—		
9. "		—	—			—	—		
10. "		—	—			72,8	0,2129		
11. "		70,1	0,2096			69,2	0,4148	0,498	
12. "		—	—			65,2			
14. VII.—10. VIII. Brutperiode					14. VII.—13. VIII. Brutperiode				
11. VIII.	2,620	72,5	0,3998	1,590	3,375	—	—		
12. "		69,1					—	—	
13. "		—	—			—	—		
14. "		67,0	0,3670			69,3	0,3986	1,651	
15. "		65,9				65,3			—
16. "		72,8	0,4202			61,5	0,3670		
17. "		—				66,6	—		
18. "		70,5	0,4046			63,7	0,4128		
19. "		68,5				—		—	
20. "		66,2	0,3922			—	0,4128	1,651	
21. "	2,675	67,8				72,0			—
22. "		—	—		3,400	—	—		
23. "		63,5	0,4014	1,296		66,2	0,3896		
24. "		69,8						68,8	—
25. "		71,5	0,3980			66,0	0,4014		
26. "		68,2				68,5		—	
27. "		66,0	0,4008			63,8	0,3982		
28. "		65,5				67,0		—	
29. "		69,1	0,4126			70,2	0,4080	0,691	
30. "		68,0				70,6			—
31. "	2,710	71,0	—		3,440	—	—		
Mittel	2,430	68,1	0,1976	0,1496	3,129	67,5	0,1943	0,1548	

Datum 1911	Ente Nr. 3				Datum 1911	Ente Nr. 3			
	Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g		Lebend- gewicht kg	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g
11. IV.	2,045	67,9	0,1826	1,214	3. VI.	68,5	0,1974	1,406	
12. "		62,4	0,1700		4. "	—	—		
13. "		65,8	0,1941		5. "	—	—		
14. "		59,7	0,1719		6. "	72,0	}0,4086		
15. "		64,7	0,1954		7. "	70,1			
16. "		66,5	0,1954		8. "	65,4	}0,3960		
17. "		—	—		9. "	63,0			
18. "		68,8	0,1962		10. "	60,8	}0,3736		
19. "	2,070	62,4	0,1859		11. "	63,0			
20. "		64,5	0,1969		12. "	—	—		
21. "		68,0	0,1984	13. "	70,5	}0,4020			
22. "		59,7	0,1738	14. "	70,8				
23. "		—	—	15. "	—	—			
24. "		69,0	0,1845	16. "	—	—	1,406		
25. "		65,0	0,1837	17. "	73,2	}0,4106			
26. "		63,2	0,1700	18. "	71,1				
27. "		—	—	19. "	68,5	0,1964			
28. "		70,0	0,1748	20. "	65,0	0,1888			
29. "		63,2	0,1621	21. "	66,5	0,1898			
30. "		61,9	0,1610	22. "	63,2	0,1816			
1. V.		65,1	0,1783	23. "	—	—			
2. "		60,5	0,1503	24. "	70,5	0,2050			
3. "		62,7	0,1610	25. "	68,2	}0,4076			
4. "		—	—	26. "	67,0				
5. "		71,0	0,1989	27. "	—	—			
6. "		65,6	0,1793	28. "	—	—			
7. "		62,5	0,1671	29. "	64,5	}0,3967	1,424		
8. "		60,0	0,1766	30. "	68,0				
9. "		—	—	1. VII.	73,0	}0,4238			
10. "	2,130	68,5	0,2000	2. "	71,2				
11. "		61,0	0,1697	3. "	68,2	}0,4192			
12. "		63,0	0,1756	4. "	—				
13. "		60,5	0,1751	5. "	69,8	}0,4172			
14. "		65,3	0,1944	6. "	70,2				
15. "		61,1	0,1664	7. "	65,4	}0,3898			
16. "		—	—	8. "	63,0				
17. "		69,5	}0,3908	9. "	61,0	}0,2063	0,870		
18. "		65,1							
19. "		67,7	}0,3868	10. "	65,0				
20. "		61,9							
21. "		66,3	0,1921	11. "	62,5	}0,3670			
22. "		67,5	0,1948	12. "	60,2				
23. "		—	—	13. "	—	—			
24. "	2,180	69,8	0,1921	14. "	69,6	Diese Eier wurden zum Brüten verwendet, daher Lecithingehalt nicht festgestellt.			
25. "		66,6	0,1928	15. "	63,8				
26. "		63,2	0,1822	16. "	70,0				
27. "		65,5	0,1885	17. "	61,2				
28. "		67,0	0,1931	18. "	66,6				
29. "		61,0	0,1832	19. "	65,1				
30. "		68,0	0,2064	20. "	68,0				
31. "		—	—	21. "	63,0				
1. VI.		69,8	}0,3988	22. "	68,6				
2. "		70,2							

Brutperiode: 24. VII.—18. VII.

Bildung von organischen Phosphorverbindungen aus Phosphaten. 467

Datum 1911	Ente Nr. 3				Datum 1911	Ente Nr. 3			
	Lebend- gewicht g	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g		Lebend- gewicht g	Ei- gewicht g	Lecithin- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g	Nuclein- P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g
19. VIII.		66,2	} 0,4080	} 1,680	27. VIII.		66,0	} 0,4002	
20. "		68,5				28. "			67,8
21. "	2,495	70,2	} 0,3982		29. "		62,4	} 0,1935	
22. "		64,8				30. "			—
23. "		63,9	} 0,4160		31. "	2,535	—		
24. "		69,0				Mittel	2,264	66,0	0,1917
25. "		68,1	} 0,3974						
26. "		63,5							

# Untersuchungen über den chemischen Aufbau des Chitins.

Von  
Hugo Brach.

(Ausgeführt unter der Leitung des a. ö. Professors Dr. O. v. Fürth  
im physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 21. Dezember 1911.)

Mit 3 Figuren im Text.

## I.

Aus der Mannigfaltigkeit jener Substanzen, die die Stützgewebe höherer und niederer Lebewesen aufbauen, ist im Laufe des letzten Decenniums das Chitin immer wieder in den Vordergrund getreten, da die bei Untersuchung desselben sich ergebenden Resultate nicht nur von rein physiologischem, sondern auch von allgemeinerem chemischen Interesse zu sein schienen.

Wir sehen im Chitin eine jener Substanzen, die dem Tier- und Pflanzenreiche gemeinsam sind. Es findet sich nicht nur in allgemeiner Verbreitung in den Tegumenten der Arthropoden, sowie auch vielfach im Bereich der Tierkreise der Mollusken, Brachiopoden, Bryozoen und Würmern, sondern ist auch im Pflanzenreich in den Zellwänden der Pilze angetroffen worden<sup>1)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Vgl. die Literatur über die Verbreitung des Chitins bei Otto v. Fürth, Vergleichende Physiologie der niederen Tiere. S. 482 bis 484, Jena 1903. — D. H. Wester, Arch. der Pharmazie 247, 4. Heft, S. 294 bis 305, 1909. — Zemplen, G. Abderhaldens Biochem. Handlexikon 2, 528 bis 529, 1911.

Es möge mir gestattet sein, der Wiedergabe von Untersuchungen, durch die ich einen Beitrag zur Konstitutionsermittlung des Chitins zu liefern hoffe, einen Überblick der wichtigsten, bisher in bezug auf den chemischen Aufbau dieser Substanz gefundenen Tatsachen vorzuschicken.

Als erster hatte Braconnot<sup>1)</sup> (1811) Chitin in Händen. Er erhielt aus Pilzen durch Behandeln mit kochendem Wasser und verdünntem Alkali eine „weiche, elastische, geschmacklose Masse“, die er Fungin nannte. Odier<sup>2)</sup> fand es (1823) in den resistenten Teilen der Crustaceen und Insekten und legte ihm den Namen Chitin ( $\chi\iota\tau\omega\nu$ ) bei. Er war der Ansicht, es mit einer stickstofffreien Substanz zu tun zu haben. In demselben Irrtum verfiel drei Jahrzehnte später Frémy<sup>3)</sup> und führte für sie den Namen Metacellulose in die Literatur ein. Auch de Barry<sup>4)</sup> sprach sie später als Pilzcellulose an.

Doch hatten schon Lassaigne<sup>5)</sup>, Payen<sup>6)</sup> und Schmidt<sup>7)</sup> mit Sicherheit Stickstoff im Chitin nachgewiesen. Aber erst die Arbeiten von Winterstein<sup>8)</sup>, Hoppe-Seyler<sup>9)</sup> und Gilson<sup>10)</sup> räumten mit den alten Irrtümern auf und bewiesen auch, daß die „Pilzcellulose“ mit Chitin identisch ist.

---

<sup>1)</sup> M. Braconnot, *Annales de Chim. et de Phys.* 79, 265; 80, 872, 1811; Schweigers Journ. 3, 121, 1811. — Payen, *Annales des Sc. natur.* (2) 11, 21, 1839; *Compt. rend.* 9, 296, 1839; *Mémoires sur les développements des végétaux* 1842. — Fromberg, *Journ. f. prakt. Chem.* 32, 198, 1844. — Mulder, *Allgem. physiol. Chem.*, S. 203. Braunschweig 1851. — J. Schloßberger und O. Döpping, *Ann. d. Chem. u. Pharm.* 52, 106, 1844. — Kaiser, *Diss.* Göttingen 1862. — De Barry, *Morphologie und Biologie der Pilze und Flechten.* Leipzig 1884. S. 9. — H. D. Wester, *Arch. f. Pharm.* 247, Heft 4, 1909.

<sup>2)</sup> A. Odier, *Mém. de la Soc. d'Hist. natur. de Paris* 1, 35—38, 1823.

<sup>3)</sup> E. Frémy *Ann. de Chim. et de Phys.* (3), 43, 93—96, 1855.

<sup>4)</sup> Siehe Anm. 1.

<sup>5)</sup> Lassaigne, *Journ. f. prakt. Chem.* 29, 323 bis 326, 1843; *Compt. rend.* 16, 1087, 1873.

<sup>6)</sup> Payen, *Compt. rend.* 17, 227 bis 231, 1843.

<sup>7)</sup> C. Schmidt, *Ann. d. Chem. u. Pharm.* 54, 298 bis 311, 1845.

<sup>8)</sup> E. Winterstein, *Ber. d. Deutsch. chem. Ges.* 27, 3113, 1894; *Ber. d. Deutsch. botan. Ges.* 11, 441, 1893; 13, 65, 1895.

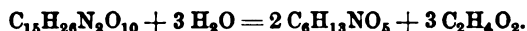
<sup>9)</sup> F. Hoppe-Seyler, *Ber. d. Deutsch. chem. Ges.* 27, 3329 bis 3331, 1894; 28, 82, 1895.

<sup>10)</sup> Gilson, *La Cellule*, 9, 2. Heft, 1893; 11, 5, 1894; *Bull. de la Soc. chim.* 9. Nov. 1894; *Ber. d. Deutsch. chem. Ges.* 28, 821, 1895; *Compt. rend.* 120, 1000, 1895; — J. Zellner, *Chem. d. höheren Pilze.* Leipzig 1907. S. 129.

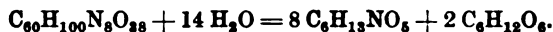
Bahnbrechend für die Erkenntnis der Konstitution des Chitins war eine Beobachtung Ledderhoses<sup>1)</sup>, der bei der Hydrolyse des Chitins eine amidierte Monose, das von ihm so benannte Glucosamin isolierte, das später als ein wichtiger Bestandteil zahlreicher Eiweißkörper (Glucoproteide) erkannt worden ist<sup>2)</sup>. Er schrieb, auf Grund seiner Untersuchung, dem Chitin folgende Formel zu:



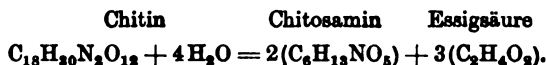
und stellte sich dessen Spaltung folgendermaßen vor:



Ledderhose war es auch, der (in Übereinstimmung mit einer älteren Beobachtung von C. Schmidt<sup>3)</sup> auf die Beteiligung der Essigsäure am Aufbau des Chitins hingewiesen hat. Dieser Ansicht trat Sundwik<sup>4)</sup> entgegen, indem er die Essigsäure als sekundäres Spaltungsprodukt hinstellte, das sich hauptsächlich neben der Buttersäure und Ameisensäure durch Zerfall des Glucosamins bilden sollte. Er suchte den Abbau des Chitins, das er sich als ein reines Aminderivat eines Kohlehydrats von der allgemeinen Formel  $n \cdot (C_{12}H_{20}O_{10})$  vorstellte, nach folgender Formel zu erklären:



Von Ledderhose und anderen Autoren<sup>5)</sup> wurden zahlreiche Elementaranalysen des Chitins ausgeführt. Unter Verwendung dieser Analysen faßte Schmiedeberg<sup>6)</sup> das Chitin als eine Acetylacetessigsäureverbindung des Chitosamins auf und erklärte seine Spaltung folgendermaßen:



Diese Formel (die die Werte C = 46,32%, H = 6,49%, N = 6,02% erfordert) stimmt mit den erwähnten Analysen nur leidlich in den

<sup>1)</sup> Ledderhose, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 9, 1200 bis 1201, 1876; Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 213 bis 227, 1878; 4, 139 bis 159, 1880.

<sup>2)</sup> Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 34, 3965, 1901. — Schmiedeberg, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 28. — I. B. Leathes, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 43. — Langstein, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 176, 1902. — S. Fränkel, Monatshefte f. Chem. 19. — Seemann, Inaug.-Diss. Marburg 1908.

<sup>3)</sup> C. Schmidt, Zur vergl. Physiologie d. Wirbellosen. Braunschweig 1845; Annal. d. Chem. u. Pharm. 54, 298, 1845.

<sup>4)</sup> E. Sundwik, Zeitschr. f. physiol. Chem. 5, 385 bis 394, 1881.

<sup>5)</sup> Siehe folgende Anm.

<sup>6)</sup> Schmiedeberg, Arch. f. experim. Pathol. 28, 395, 1891.

Kohlen- und Wasserstoffwerten überein, während die Stickstoffwerte viel höher sind:

	C	H	N
	%	%	%
Schmidt (1845) . . . . .	46,66	6,60	6,53 <sup>1)</sup>
Frémy (1855) (Chitin v. Crustaceen) . . . . .	43,3/4	6,6/7	— <sup>2)</sup>
Schloßberger (1856) (Chitin von Langusten) . . . . .	—	—	6,5 <sup>3)</sup>
Péligot (1858) (Chitin von Seidenraupen) . . . . .	47,38—48	6,90—7,02	6,15—8,30 <sup>4)</sup>
Städeler (1859) (Chitin von <i>Astacus fluviatilis</i> ) . . . . .	46,32	6,40	6,14 <sup>5)</sup>
Bütschli (1875) . . . . .	—	—	7,4 <sup>6)</sup>
Children und Daniel . . . . .	46,08	5,96	10,29 <sup>7)</sup>
Lelmann . . . . .	46,73	6,49	5,59 <sup>8)</sup>
Ledderhose (1878/79) (Chitin von Crustaceen, bei 110° getrocknet) . . . . .	45,69	6,42	7,00 <sup>9)</sup>
Sundwik (1881) (Chitin von Crustaceen, bei 130 bis 135° getrocknet) . . . . .	46,78	6,41	— <sup>10)</sup>
Krukenberg (1887) (Sepienschulpe) . . . . .	46,57	6,39	7,37 <sup>11)</sup>
Araki (1895) . . . . .	46,11—46,35	6,29—6,68	6,01—6,39 <sup>12)</sup>
Gilson (1895) . . . . .	46,11	6,98	6,17 <sup>13)</sup>
K. S. Iwanoff (1902) . . . . .	46,21	6,28	8,22 <sup>14)</sup>
Offer (1908) . . . . .	45,53	6,92	7,22 <sup>15)</sup>
Scholl (1908) (Pilzchitin von <i>Boletus edulis</i> ) . . . . .	46,29	6,41	6,03 <sup>16)</sup>

<sup>1)</sup> C. Schmidt, siehe Anm. 3 auf S. 470.

<sup>2)</sup> E. Frémy, siehe Anm. 3 auf S. 469.

<sup>3)</sup> Schloßberger *Annal. d. Chem. u. Pharm.* 98, 115 bis 120, 1856.

<sup>4)</sup> Péligot, *Compt. rend.* 47, 1034—1039, 1858.

<sup>5)</sup> Städeler, *Annal. d. Chem. u. Pharm.* 111, 21, 1859.

<sup>6)</sup> Bütschli, *Med. Centralbl.* 18, 588, 1875.

<sup>7)</sup> Children and Daniel, *Todds Cyclop. of anat. and physiol.* 2, 882.

<sup>8)</sup> Lelmann, zitiert nach *Abderhaldens Biochem. Handlexikon* 2, 527, 1911.

<sup>9)</sup> Ledderhose, siehe Anm. 1 auf S. 470.

<sup>10)</sup> Sundwik, siehe Anm. 4 auf S. 470.

<sup>11)</sup> Krukenberg, *Zeitschr. f. Biol.* 22, 480, 1887.

<sup>12)</sup> Araki, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 20, 498 bis 510, 1895.

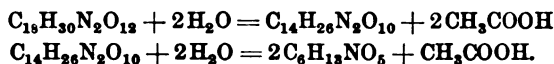
<sup>13)</sup> Gilson, *Compt. rend.* 120, 1000, 1895.

<sup>14)</sup> Iwanoff, *Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol.* 1, 524, 1902.

<sup>15)</sup> Offer, diese *Zeitschr.* 7, 117 bis 127, 1908.

<sup>16)</sup> Scholl, *Monatsh. f. Chem.* 29, 1023 bis 1036, 1908; *Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. Mathem.-naturw. Kl.* 117, Abt. I, Mai 1908.

Einen großen Fortschritt für die Lösung der Konstitutionsfrage des Chitins bedeuteten die in Hoppe-Seylers Laboratorium ausgeführten Arbeiten über das „Chitosan“<sup>1)</sup>. Araki<sup>2)</sup> stellte dort fest, daß die Umwandlung des Chitins durch Kalischmelze in das in verdünnten Säuren leicht lösliche Chitosan unter Abspaltung von Essigsäure vor sich geht. Er schrieb dem Chitosan die Formel  $C_{14}H_{26}N_2O_{10}$  zu und glaubte den Abbau des Chitins in folgender Gleichung formulieren zu können:



Einen wesentlichen Schritt nach vorwärts bedeuten die Arbeiten Fränkels<sup>3)</sup>. Fränkel und Kelly<sup>4)</sup> gelang es nach vorsichtigem Hydrolysieren von Chitin mit 70 bis 72% Schwefelsäure bei Zimmertemperatur zwei Zwischenprodukte zu isolieren. Das eine, das Monoacetylchitosamin, wurde von Fränkel und Kelly mit einem schon von Breuer<sup>5)</sup> synthetisch gewonnenen Monoacetylchitosamin verglichen und identisch gefunden und klärte die Stellung der Acetylgruppe im Chitin auf, während das zweite, das Monoacetyldichitosamin zeigt, „daß die Auffassung des Chitins und des Chitosans als einer Biose, die mit drei Acetylgruppen oder einer Biose, die mit einer Acetylacetessigsäure respektive Essigsäure kombiniert ist, unzulässig erscheint“.

In einer weiteren, in Fränkels Laboratorium ausgeführten Untersuchung kommt Offer<sup>6)</sup> zu dem Schlusse, daß das Chitin ein polymeres Monoacetyldiglucosamin sei, dessen Jodreaktion analog der von Stärke und Glykogen wäre.

Weitere Analogien zu polymeren Kohlenhydraten ergeben sich aus Untersuchungen von v. Fürth und Scholl<sup>7)</sup> über die Bildung von Nitrochitinen bei der Einwirkung stärkster rauchender Salpetersäure auf Chitin.

Hier sei auch eine Arbeit Westers<sup>8)</sup> erwähnt, in der die Identität des Chitins verschiedener Tiere und Pflanzen durch Ableitung identischer

1) Rouget, Compt. rend. 48, 792 bis 795, 1859, hatte schon dieses Abbauprodukt des Chitins in Händen, das er durch Erhitzen von Chitin mit Ätzkali erhalten hatte, doch berichtet er nur über die Violettfärbung mit Jod und die Löslichkeit in schwachen Säuren, aus denen es bei Alkali- oder Alkoholzusatz fällt.

2) T. Araki, siehe Anm. 12 auf S. 471.

3) S. Fränkel, Monatsb. f. Chem. 19.

4) S. Fränkel und A. Kelly, Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. Mathem.-naturw. Kl. 110, Abt. IIb, Dezember 1901.

5) Breuer, Berl. Ber. 81, II, 2898.

6) Th. R. Offer, diese Zeitschr. 7, 117—127, 1908.

7) O. Fürth und E. Scholl, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 188—198, 1907.

8) D. H. Wester, Arch. d. Pharmazie 247, Heft 4, 1909.



Derivate (salzsaures Glucosamin, Chitosansulfat usw.) erwiesen wird. Auch gelingt es ihm, die primäre Amidgruppe des Glucosamins im Chitosan durch Diazotierung des letzteren nachzuweisen, da unter Stickstoffentwicklung ein stickstofffreier Körper gebildet werden soll.

Die Stickstoffverteilung wurde im Chitin von Rothera<sup>1)</sup> ermittelt, allerdings nur im Anhang an eine Untersuchung über die Stickstoffbindung im Eiweiß. Er fand:

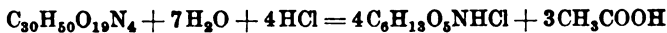
Gesamt-N	Amid-N	Melanin-N	Monoamino-N	Diamino-N
6,97	2,186	0,265	3,94	0,08
—	2,8	0,163	—	—

Die Werte für Amidstickstoff sind mit einigem Vorbehalt aufzunehmen, denn „immerhin ergab sich“, wie der Autor selbst zugebt, „daß die Abspaltung des Amidstickstoffes in diesem Falle wenigstens zum Teil ein sekundärer Vorgang ist. Bei 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub>stündigem (!) Kochen von Chitin mit Salzsäure und Zinnchlorür wurden bloß 1,14, bei 7stündigem (!) Kochen 2,12% Amidstickstoff erhalten“.

Erfahrungen, die von Lenk<sup>2)</sup> beim Glucosamin aus Chitosan und später von mir bei Glucosaminbestimmungen des Chitin gemacht worden sind, zeigen, daß durch längere Einwirkung von Salzsäure bei Gegenwart von Zinnchlorür in der Siedehitze das aus Chitin gebildete Glucosamin zerstört, und daß bei einer 2stündigen Dauer der Hydrolyse das Maximum der Glucosaminausbeute erreicht wird. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß der Amidstickstoff, den Rothera im Chitin gefunden hat, zum größten Teil sekundärer Natur ist. Ich habe die Untersuchung der Stickstoffverteilung im Chitosan nach einer neuen Methode aufgenommen und berichte darüber unter den Analysen.

Eine Löslichkeit des Chitins nach längerem Behandeln in der Kälte mit schwacher Salzsäure wollen C. L. Alsberg und C. A. Hedlom<sup>3)</sup> gefunden haben, doch erscheint nach den Untersuchungen von Wester eine dabei stattfindende Zersetzung wahrscheinlich.

Eine weitere einschlägige Arbeit ist die von Irvine<sup>4)</sup>, der die Menge des aus der Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure gewonnenen salzsauren Glucosamins aus dem Drehungsvermögen desselben bestimmt und sie mit der Formel



<sup>1)</sup> Rothera, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 448, 1904.

<sup>2)</sup> E. Lenk (Löwy), diese Zeitschr. 23, Heft 1 u. 2, S. 47—60, 1909.

<sup>3)</sup> Journ. of Biol. Chem. 8, 483—498, 1909. — Centralbl. f. Physiol. 23, 882, 1909.

<sup>4)</sup> J. C. Irvine, Journ. Chem. Soc. 95/96, 564—570, 1909.



Das Molekulargewicht des Chitosans<sup>1)</sup> konnte vorläufig nicht festgestellt werden, da das Chitosansulfat nur in verdünnten Säuren, jedoch nicht in indifferenten organischen Verbindungen löslich ist.

Wenn also einerseits durch die mitgeteilten Untersuchungen die Beteiligung von Monoacetyldiglucoaminkomplexen am Aufbau des Chitins sichergestellt ist, erscheint andererseits der Zusammenhang zwischen Chitosan und Chitin, die Konstitution des letzteren und die Natur jener chemischen Vorgänge, die den Übergang des Chitins in Chitosan bewirken, durchaus un- aufgeklärt; und ich habe mich, einer Aufforderung des Herrn Prof. v. Fürth folgend, bemüht, durch die nachstehend ausgeführten Untersuchungen zur Aufklärung dieser Fragen beizutragen.

## II. Darstellung des Ausgangsmaterials.

Als Ausgangsmaterial für meine Untersuchungen benutzte ich die Tegumente von *Nephrops norvegicus*, die, dank des liebenswürdigen Entgegenkommens des Herrn Prof. Dr. Cori, von der k. k. zoologischen Station in Triest beigestellt worden sind. Die Reingewinnung des Chitins wurde in ähnlicher Weise, wie sie Offer und später Lenk beschrieben hatten, vorgenommen.

Die Krebschalen wurden mit Wasser gewaschen und von den anhaftenden Fleischresten befreit, hierauf in kleine Stücke zerschnitten und zur Entkalkung mehrere Tage mit verdünnter Salzsäure behandelt, die erneuert wurde, solange sich noch Kohlensäureentwicklung zeigte. Die entkalkten Schalen wurden wiederholt mit Wasser gewaschen und hierauf zweimal mit 20%iger Kalilauge einige Stunden ausgekocht, um das vorhandene Eiweiß zu zerstören, dann wieder mit Wasser abgespült. Sodann wurden mit verdünnter Kaliumpermanganatlösung die vorhandenen Farbstoffe oxydiert und durch Behandlung mit Natriumbisulfit und Salzsäure und darauffolgendes gründliches Waschen das Chitin vom ausgeschiedenen Braunstein und über-

---

<sup>1)</sup> Ein Versuch einer Molekulargewichtsbestimmung des Chitins wurde von C. L. Alsberg und C. A. Hedlom gemacht. Aus der Gefrierpunktserniedrigung der schwach salzsauren Lösung berechnete sich eine Minimalzahl von 1974; doch kann hier eine Zersetzung des Chitins kaum als ausgeschlossen gelten. Siehe auch Anm. 3 auf S. 473.

schüssigen Permanganat befreit. Die so farblos erhaltenen Stücke wurden abgepreßt und getrocknet.

Nach dieser ersten Reinigung wurde das Chitin mit einer Handmühle in kleine Stücke zermahlen und einer zweiten Reinigung unterzogen. Es wurde wieder zweimal mit 20%iger Kalilauge etwa 6 Stunden auf dem Wasserbade gekocht, hierauf gründlich gewaschen und zur Entfernung des eventuell gebildeten Chitosans mehrmals mit 10%iger Essigsäure behandelt. Dann wurde mit verdünnter Kaliumpermanganatlösung, Natriumbisulfidlösung und verdünnter Salzsäure gebleicht und gründlich im fließenden Wasser einige Stunden gewaschen, wobei die Masse in fortwährender Bewegung gehalten wurde. Nach dem darauffolgenden Abnutschen auf gehärtetem Filter wurde das Chitin unter absolutem Alkohol einen Tag im verschlossenen Pulverglase belassen, hierauf abgenutscht, mit absolutem Äther ebenso behandelt und schließlich im Vakuum bei 60° getrocknet.

Von diesem Chitin wurde zu den Analysen im Wäggläschen stets ein Teil im Trockenschrank bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ein Teil des so gereinigten Chitins wurde in einer Kugelmühle zu feinem Pulver gemahlen und einer dritten Reinigung in oben beschriebener Weise unterzogen. Die Analysen, die mit dieser Substanz ausgeführt worden sind, stimmen, wie die später angeführten Zahlen beweisen, mit den Analysen der zweimal gereinigten Substanz so gut überein, daß für die Reinheit der Substanz genügend Garantie geboten ist.

Ich erwähne, daß das zweimal gereinigte Chitin keine wägbaren Aschenmengen enthalten hatte, während sich in dem dreimal gereinigten Produkte einige Aschenreste vorfanden, offenbar vom Biskuitpulver herrührend, das sich von den Kugeln der Kugelmühle bei dem Zerkleinerungsvorgange abgelöst hatte.

### III. Analysen.

Die zahlreichen, von früheren Autoren ausgeführten Analysen des Chitins weisen untereinander, wie sich aus obiger Zusammenstellung<sup>1)</sup> ergibt, in den Kohlenstoff- und Wasserstoffwerten, besonders aber in den Stickstoffwerten Widersprüche

---

<sup>1)</sup> Siehe Einleitung.

auf, die nicht auf die Verschiedenheit des Materials (dessen Identität bewiesen ist), sondern auf die verschiedenartige Reinigung desselben zurückzuführen sind. Dabei ist insbesondere auf den Umstand nicht entsprechend Rücksicht genommen worden, daß nicht nur Vermengung desselben mit Eiweißresten zu unrichtigen Resultaten führen könne, sondern auch eine zu starke Alkalieinwirkung durch partielle Chitosanbildung eine Verschiebung der Analysenzahlen herbeizuführen vermag.

Deshalb war es angezeigt, mit sorgfältigst gereinigtem Material neue Analysen vorzunehmen, auf deren Ausführung ich mir jetzt überzugehen erlaube.

### 1. Verbrennungen.

Mit der zweimal gereinigten Substanz wurden, nach dem Trocknen bei 110° bis zur Gewichtskonstanz, folgende Verbrennungen (im elektrischen Ofen von Heräus) ausgeführt.

1. 0,2093 g Substanz gaben 0,3575 g Kohlensäure und 0,1191 g Wasser  
entsprechend 46,58% Kohlenstoff  
und 6,37% Wasserstoff  
(keine wägbare Asche).
2. 0,1941 g Substanz gaben 0,3317 g Kohlensäure und 0,1061 g Wasser,  
entsprechend 46,61% Kohlenstoff  
und 6,12% Wasserstoff  
(keine wägbare Asche).
3. 0,1907 g Substanz gaben 0,3257 g Kohlensäure und 0,1128 g Wasser,  
entsprechend 46,58% Kohlenstoff  
und 6,62% Wasserstoff.
4. 0,1578 g Substanz gaben 0,2672 g Kohlensäure,  
entsprechend 46,18% Kohlenstoff.
5. 0,1950 g Substanz gaben 0,1130 g Wasser,  
entsprechend 6,48% Wasserstoff.

Die mit dem pulverisierten und dreimal gereinigten Chitin ausgeführten Analysen ergaben folgende Resultate:

6. 0,1610 g Substanz gaben 0,2714 g Kohlensäure und 0,0969 g Wasser,  
entsprechend 46,35% Kohlenstoff  
und 6,79% Wasserstoff  
(0,0013 g Asche, die bei der Berechnung berücksichtigt wurde).
7. 0,1837 g Substanz gaben 0,3079 g Kohlensäure und 0,1023 g Wasser,  
entsprechend 46,12% Kohlenstoff  
und 6,28% Wasserstoff  
(0,0016 g Asche)<sup>1</sup>).

---

<sup>1</sup>) Asche (Mittelwert aus der 6. und 7. Analyse): 0,83%.

Aus der Übereinstimmung der Analysen 6 und 7 mit den vorhergehenden ist zu ersehen, daß die dritte Reinigung die Reinheit des zweimal gereinigten Chitins nicht mehr erhöht, was auf vollkommene Einheitlichkeit desselben schließen läßt.

Die Mittelwerte der ausgeführten Verbrennungen betragen:

46,40 % Kohlenstoff.  
und 6,44 % Wasserstoff.

## 2. Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl.

### a) Des zweimal gereinigten Chitins.

1. 0,2768 g Substanz verbrauchten 13,10  $\frac{2}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,63 % Stickstoff.
2. 0,3091 g Substanz verbrauchten 14,35 com  $\frac{2}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,50 % Stickstoff.
3. 0,3148 g Substanz verbrauchten 15,45 com  $\frac{2}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,88 % Stickstoff.
4. 0,3203 g Substanz verbrauchten 15,20 com  $\frac{2}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,65 % Stickstoff.
5. 0,2506 g Substanz verbrauchten 11,95 com  $\frac{2}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,68 % Stickstoff.
6. 0,2919 g Substanz verbrauchten 14,15 com  $\frac{2}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,79 % Stickstoff.

Mittelwert: 6,69 % Stickstoff.

### b) Des pulverisierten und ein drittesmal gereinigten Chitins.

1. 0,2850 g Substanz verbrauchten 13,32 ccm  $\frac{2}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,55 % Stickstoff.
2. 0,3114 g Substanz verbrauchten 14,57 com  $\frac{2}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,56 % Stickstoff<sup>1)</sup>.

Mittelwert aus der Gesamtheit der an Nephrops-Chitin ausgeführten N-Bestimmungen:

6,66 % Stickstoff.

Ich habe überdies einige Analysen mit Chitin aus der Rückenschuppe von Loligo (Kalmar) ausgeführt, das durch seine kalkfreie Beschaffenheit für die Reinigung von vornherein besonders günstige Verhältnisse darbietet:

### c) Von Chitin aus Loligo.

(Einmalige Reinigung.)

1. 0,2838 g Substanz verbrauchten 13,75 com  $\frac{2}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,79 % Stickstoff.

<sup>1)</sup> Bei diesen beiden Analysen wurden 0,83 % Asche in Rechnung gezogen. Vgl. II. Darstellung des Ausgangsmaterials; dann 6. und 7. Verbrennung.

2. 0,2791 g Substanz verbrauchten 13,70 ccm  $\frac{1}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,88% Stickstoff.

3. 0,2976 g Substanz verbrauchten 14,45 ccm  $\frac{1}{10}$ -Schwefelsäure, entsprechend 6,80% Stickstoff.

Mittelwert: 6,82% Stickstoff.

### 3. Elementare Zusammensetzung.

Aus den von mir ausgeführten Analysen ergeben sich somit für die prozentuale Zusammensetzung des Chitins folgende Mittelwerte:

$$\begin{array}{r} \text{C} = 46,40\% \\ \text{H} = 6,44\% \\ \text{N} = 6,66\% \\ \text{O} = 40,50\% \\ \hline 100,00\% \end{array}$$

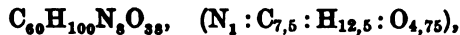
die mit den Mittelwerten<sup>1)</sup> aus den Analysen früherer Autoren gut übereinstimmen:

$$\begin{array}{r} \text{C} = 46,55\% \\ \text{H} = 6,57\% \\ \text{N} = 6,64\% \\ \text{O} = 40,24\% \\ \hline 100,00\% \end{array}$$

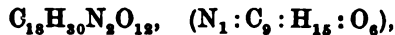
Die aus den Mittelwerten auf den Stickstoff als Einheit berechnete Atomrelation ist:

$$\text{N}_1 : \text{C}_{8,18} : \text{H}_{13,45} : \text{O}_{5,33}$$

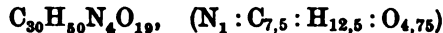
Sie läßt sich weder mit der Chitinformel von Sundwik:



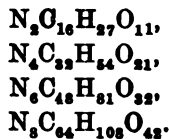
noch mit der von Araki:



oder der von Irvine aufgestellten:



(halbe Sundwische Formel!) in Einklang bringen. Hingegen erhält man aus der Relation zwanglos etwa folgende Bruttoformeln:



<sup>1)</sup> Berechnet von Wester, l. c.

Berechnet man aus diesen Formeln die Prozentzahlen für Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff, so erhält man folgende Werte:

	Gefunden Mittelwert %/o	$N_2C_{16}H_{27}O_{11}$ %/o	$N_4C_{32}H_{54}O_{21}$ %/o	$N_6C_{48}H_{81}O_{32}$ %/o	$N_8C_{64}H_{108}O_{41}^1)$ %/o
C	46,40	45,37	46,24	45,97	46,69
H	6,44	6,43	6,55	6,46	6,62
N	6,66	6,62	6,75	6,70	6,81
O	40,50	41,58	40,46	40,87	39,88

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß die von mir gefundenen Werte am besten mit der Formel  $N_4C_{32}H_{54}O_{21}$  oder einem Vielfachen derselben übereinstimmen.

Vergleicht man diese Formel mit der von Irvine (die Hälfte der Formel von Sundwik) und subtrahiert von ihr die letztere

$$\begin{array}{r} C_{32}H_{54}N_4O_{21} \\ C_{20}H_{50}N_4O_{19} \\ \hline C_2H_4O_2 \end{array}$$

so ergibt sich die Tatsache, daß die Formeln um eine Essigsäure differieren.

Diese Differenz in den Formeln erheischte Aufklärung und ließ voraussehen, daß hier die Acetylbestimmung im Chitin zum Ziele führen werde.

#### IV. Acetylbestimmungen.

##### a) Methodik.

Zur quantitativen Bestimmung der im Chitinmolekül vorhandenen Essigsäure ging ich im wesentlichen nach dem Verfahren von Wenzel<sup>2)</sup> vor, das von Lenk<sup>3)</sup> für die Essigsäurebestimmung im Chitosan modifiziert worden war. Für diese Bestimmungen verwendete ich einen von mir abgeänderten Apparat nach Wenzel, der sich als sehr praktisch erwiesen hatte.

<sup>1)</sup> Die Prozentwerte für  $C_{64}H_{108}N_8O_{42}$  sind natürlich dieselben wie für  $C_{32}H_{54}N_4O_{21}$ .

<sup>2)</sup> Wenzel, *Monatsh. f. Chem.* 1897, 659.

<sup>3)</sup> E. Lenk (Löwy), siehe Anm. 2 auf S. 473.



Der Apparat (Fig. 1) besteht aus einem Birnkühler *A*, an dessen unterem Ende mittels eines Dreiweghahnes *B* ein schief nach aufwärts steigendes Glasrohr *C* angeschmolzen und mit einem kleinen Kühlmantel versehen ist. Dieses Rohr taucht in einen mit Glasperlen gefüllten Rundkolben *D* ein und ist mit einem durchbohrten Gummistopfen an demselben befestigt. Der Rundkolben befindet sich in einem Wasserbade.

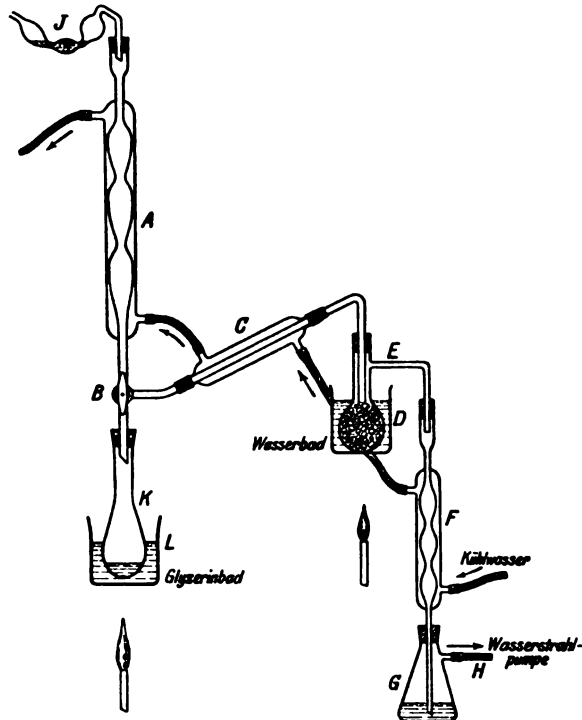


Fig. 1.

Von dem Halse dieses Kolbens geht ein rechtwinklig abgebrochenes Rohr *E* nach abwärts in die Tulpe eines Birnkühlers *F*, wo es mittels eines Gummistopfens befestigt ist. Der Kühler taucht in einen Absaugkolben *G*, der ebenfalls durch einen Gummistopfen verschlossen ist. Bei *H* wird evakuiert. *J* ist ein U-förmig gebogenes Kugelrohr, das mit Natronlauge gefüllt ist, um die eventuell entweichende Essigsäure zurückzuhalten. Die Kühler sind hintereinander geschaltet.

Zur Hydrolyse kommt die Substanz in einen kleinen Kjeldahlkolben *K* und wird darin mit 10 ccm konzentrierter Salzsäure und 1 g Zinnchlorür im Glycerinbad unter Rückflußkühlung zum schwachen Sieden erhitzt. Als Optimum wurde für die Dauer der Hydrolyse durch Versuche die Zeit von 2 Stunden ermittelt, da unter denselben Bedingungen auch ein Höchstwert an Glucosamin erzielt wurde.

Um mich zu überzeugen, ob eine größere Menge Kochsalz, ferner die Anwesenheit von Zinnchlorür das Resultat der Analyse beeinflussen, machte ich folgenden Versuch:

Zu 0,1268 g Natriumacetat (Kahlbaum) wurden 10 g Kochsalz und 1 g Zinnchlorür zugesetzt und gut durchgemischt. Hierauf ließ ich 20 ccm Phosphorsäure (nach Wenzel) zufließen. Dann erhitze und evakuierte ich und destillierte bis zur Trockne ab. Hierauf wurde mit je 20 ccm Wasser noch zweimal bis zur Trockne nachdestilliert.

0,1268 g Natriumacetat verbrauchten 15,6 ccm  $\frac{2}{10}$ -Natronlauge,  
entsprechend 52,9% Acetyl,  
berechnet 52,44% Acetyl.

Die Anwesenheit von Kochsalz und Zinnchlorür übt also keinen merkbaren Einfluß auf die Acetylbestimmung aus.

Zur Acetylbestimmung ging ich folgendermaßen vor:

Gegen 0,5 g bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes Chitin wurden mit 10 ccm konzentrierter Salzsäure und 1 g Zinnchlorür, zur Verminderung der Bildung von Huminsubstanzen, im Kjeldahlkolben unter Rückflußkühlung im Glycerinbad erhitzt. Hierauf wurde die rötlichbraune Lösung verdünnt und mit der vorgelegten Natronlauge (*J*), die durch den Kühler gegossen wurde, neutralisiert, worauf der Kühler nachgewaschen wurde. Dann wurde der Dreiweghahn (*B*) umgestellt, so daß jetzt der Kjeldahlkolben mit dem Destillierrohr *C* kommunizierte und bei schwachem Evakuieren die Lösung zur Trockne eingedampft.

Nachher wurden durch den Kühler 20 ccm Phosphorsäure (nach Wenzel) zufließen gelassen und die weitere Bestimmung nach den Angaben Wenzels durchgeführt.

#### b) Analysen.

1. 0,3010 g Chitin verbrauchten 16,55 ccm  $\frac{2}{10}$ -Natronlauge,  
entsprechend 23,65% Acetyl.
2. 0,3803 g Chitin verbrauchten 20,95 ccm  $\frac{2}{10}$ -Natronlauge,  
entsprechend 23,70% Acetyl.
3. 0,4391 g Chitin verbrauchten 23,35 ccm  $\frac{2}{10}$ -Natronlauge,  
entsprechend 22,88% Acetyl.
4. 0,4318 g Chitin verbrauchten 21,55 ccm  $\frac{2}{10}$ -Natronlauge,  
entsprechend 21,47% Acetyl.
5. 0,4386 g Chitin verbrauchten 21,0 ccm  $\frac{2}{10}$ -Natronlauge,  
entsprechend 20,59% Acetyl.
6. 0,4943 g Chitin verbrauchten 26,0 ccm  $\frac{2}{10}$ -Natronlauge,  
entsprechend 22,63% Acetyl.

Mittelwert: 22,50% Acetyl.

Die Mittelwerte der Stickstoff- und Acetylbestimmungen geben die Relation:

$$N : \text{Acetyl} = 1 : 1,100;$$

ein mit den Elementaranalysen übereinstimmendes und die aus ihnen gezogenen Schlüsse bestätigendes Ergebnis.

Berechnet man die prozentuale Anteilnahme der Essigsäure am Aufbau des Chitinmoleküls für die früher diskutierten Formeln:

	Gefunden, Mittelw.	$C_{16}H_{27}N_2O_{11}$	$C_{32}H_{54}N_4O_{21}$	$C_{48}H_{81}N_6O_{32}$	$C_{64}H_{108}N_8O_{41}$
Acetyl. %	22,5	20,33	20,72	20,59	20,92

so zeigt sich wieder eine ausreichende Übereinstimmung mit der Formel  $(N_4C_{32}H_{54}O_{21})_x$ .

Der etwas höher erhaltene Wert für Acetyl, als die Theorie ihn erfordert, erklärt sich aus der Unmöglichkeit, bei längerer Hydrolyse die Zersetzung des schon gebildeten Glucosamins vollkommen zu verhindern.

Aus den vorerwähnten Untersuchungen ergibt sich also die Tatsache, daß im Chitinmolekül weder, wie Ledderhose, Schmiedeberg und Araki behauptet haben, auf zwei Stickstoffe drei Acetylene, noch wie Irvine annahm, auf vier Stickstoffe drei Acetylene, oder wie Offer angibt, auf zwei Stickstoffe ein Acetyl zu rechnen ist, sondern daß das Chitin auf je vier Stickstoffe vier Acetylene enthält.

#### V. Verteilung der Essigsäurereste im Chitinmolekül.

Die Verteilung der Essigsäure auf die einzelnen Stickstoffatome und die Art ihrer Bindung war noch immer eine offene Frage. Klargestellt war nur durch die Arbeiten Fränkels und seiner Schule, daß die Essigsäure säureamidartig am Stickstoff gebunden sei. Um die Frage nun aufzuklären, ob je zwei Essigsäuren etwa in Form von Acetessigsäure<sup>1)</sup> an zwei Stick-

<sup>1)</sup> Fränkel diskutiert in Übereinstimmung mit Schmiedeberg eine Aneinanderkettung von drei Essigsäureestern in Form von Acetylacetessigsäure: „Aus den bis nun vorliegenden Untersuchungen läßt sich der Schluß ziehen, . . ., daß das Chitin und Chitosan keineswegs die angenommene einfache Zusammensetzung besitzen, sondern vielmehr höher zusammengesetzte stickstoffhaltige, am N acetylierte, respektive mit Acetylacetessigsäure verbundene Polysaccharide sind.“ (Zit. nach Fränkel und Kelly, siehe Anm. 5 auf S. 472.)

stoffen gebunden, und zwei Stickstoffe frei von Essigsäure sind, oder ob sich die Essigsäuren auf alle vier Stickstoffe gleichmäßig verteilen, ließ ich mich bei nachfolgender Untersuchung von folgender Erwägung leiten: Wäre Essigsäure in der Form von Acetessigsäure gebunden, so müßte bei der Hydrolyse mit verdünnten Säuren aller Erwartung nach sich Aceton abspalten (Ketonspaltung). Es wurden von mir in dieser Richtung folgende Versuche ausgeführt:

1. Versuch. Gegen 1 g Chitin wurde in einen Rundkolben mit überschüssiger 10%iger Schwefelsäure versetzt. Der Rundkolben war mit einem absteigenden Kühler verbunden, dessen Ende mittels eines Vorstoßes in ein Erlenmeyerkölbchen, das mit alkalischer Jodlösung gefüllt war (Liebensch Reaktion), tauchte. Der Kolben wurde im Glycerinbad erwärmt und die verdünnte Schwefelsäure zum Sieden gebracht. Nach einiger Zeit trat Lösung ein, und nach zweistündiger Destillation wurde das Destillat untersucht. Die Flüssigkeit war klar geblieben, zeigte aber schwachen Jodoformgeruch, trotzdem fiel auch nach 24 stündigem Stehen kein Niederschlag aus. Ein ähnlicher

2. Versuch wurde mit 10%iger Salzsäure gemacht und führte zu demselben Ergebnis. Bei einem

3. Versuch ging ich nach der Angabe Fränkels<sup>1)</sup>, der mitteilt, Aceton am Geruche erkannt zu haben, vor:

8,2930 g Chitin wurden mit 100 ccm 70%iger Schwefelsäure bei Zimmertemperatur im Erlenmeyerkolben, dem mittels eines U-förmigen Kugelrohres alkalische Jodlösung vorgelegt war, 24 Stunden hindurch stehen gelassen. Nach dieser Zeit hatte sich das Chitin vollständig gelöst und die Lösung eine klare rötlichbraune Färbung angenommen; bald nach Zusatz der Schwefelsäure konnte das Auftreten von Essigsäure und schwefliger Säure konstatiert werden, hingegen war ein Geruch nach Aceton nicht zu bemerken. Die Lösung wurde hierauf in einen Rundkolben, mit 500 ccm eisgekühlten Wassers vorsichtig eingetragen, wobei die Temperatur im Kolben nie 20° überstieg, also ein Entweichen des eventuell vorhandenen Acetons ausgeschlossen war. Hierauf wurde die verdünnte Lösung einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Es wurden drei Fraktionen aufgefangen. Die erste Fraktion gab mit alkalischer Jodlösung einen äußerst schwachen Jodoformgeruch, blieb jedoch klar. Unter dem Mikroskop besehen, konnten nach längerem Untersuchen zahlreicher Tropfen nur einige vereinzelte sechseckige Plättchen, wie sie der Krystallform des Jodoforms entsprechen, gefunden wurden. Die beiden anderen Fraktionen ergaben ein vollständig negatives Ergebnis.

Diese Versuche zeigen nun, daß von einer Acetonbildung, die auf Spaltung der Acetessigsäure zurückzuführen wäre, keine Rede sein kann; denn bei der Spaltung einer Gewichtsmenge Acetessigesters, die der

<sup>1)</sup> Fränkel und Kelly, siehe Anm. 5 auf S. 472.

theoretischen Gewichtsmenge Essigsäure von 8,2930 g Chitin entsprach, gaben, beim Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure unter Wasserdampfdestillation, die ersten übergelenden Tropfen mit alkalischer Jodlösung sofort einen voluminösen Niederschlag. Es wurde auch daran gedacht, daß möglicherweise flüchtige Acetonverbindungen, wie Emil Fischer sie beschrieben hatte<sup>1)</sup>, auftreten, die den Nachweis des Acetons verhindern könnten. Doch ergab ein Versuch mit Acetessigester, der bei der Gegenwart von Glucosamin in 10%iger Schwefelsäure der Wasserdampfdestillation unterworfen wurde, in dieser Richtung ein negatives Resultat.

Es kann also von einer Bindung der Essigsäure im Chitin in Form von Acetessigsäure nicht gesprochen werden, hingegen ist anzunehmen, daß die Essigsäure in säureamidartiger Form am Stickstoff gebunden ist, und zwar an je einem Stickstoffe eine Essigsäure.

## VI. Quantitative Glucosaminbestimmungen

nach der Zuckerbestimmungsmethode von Kumagawa-Suto<sup>2)</sup>  
(für Glucosamin von Lenk<sup>3)</sup> angewendet).

Zur Vervollständigung obiger Untersuchungen wurden auch quantitative Glucosaminbestimmungen ausgeführt, deren Ergebnisse hier angeführt seien:

Bei diesen Bestimmungen wurde folgendermaßen vorgegangen: Gegen 0,5 g Chitin wurden mit 10 ccm konzentrierter Salzsäure unter Zusatz von 1 g Zinnchlorür (zur Verhinderung der Huminförmigkeit) 2 Stunden lang<sup>4)</sup> unter Rückflußkühlung im Glycerinbad zum gelinden Sieden erhitzt (Thermostat). Die erhaltene gelbliche, klare Lösung wurde mit Wasser verdünnt, durch Schwefelwasserstoff vom Zinn befreit, das Filtrat auf 200 ccm aufgefüllt. Vier aliquote Teile der Lösung wurden gesondert titriert.

An dem Titrationsapparate ersetzte ich das Glasventil im Erlenmeyerkolben, daß beim Schließen ein Vakuum im Apparat erzeugt und andererseits oft unzuverlässig schließt, was ein

<sup>1)</sup> E. Fischer, Kohlenhydrate und Fermente, Berlin 1909, S. 90, 734, 755, 762.

<sup>2)</sup> Kumagawa-Suto, Ein Beitrag zur Zuckertitrierung mit Ammoniak und Kupferlösung nach Pavy. Salkowski-Festschrift 1904.

<sup>3)</sup> Lenk (Löwy), siehe Anm. 2 auf S. 473.

<sup>4)</sup> Diese Zeit hat sich als Optimum für die Glucosaminbildung erwiesen.

Zurücksteigen der Schwefelsäure in den Filtrationskolben zur Folge hat, wie Fig. 2 zeigt, durch ein Zweikugelsystem.

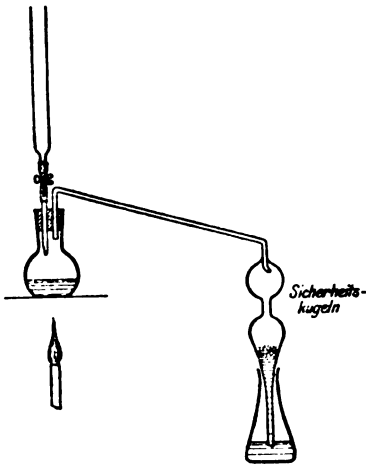


Fig. 2.

Aus dem Mittel dieser Titrationen wurde die Glucosamin- ausbeute berechnet.

1. 0,5312 g Chitin gaben, nach dieser Angabe behandelt, 0,45197 g Glucosamin, entsprechend 85,08%.

2. 0,5024 g Chitin gaben 0,42975 g Glucosamin, entsprechend 85,54%.

Mittelwert:

85,31% Glucosamin<sup>1)</sup>.

Die Relation Stickstoff: Acetyl:Glucosamin berechnet sich aus den Mittelwerten, wie: 1:1,100:1,0024.

Als Resultat vorstehender Versuche ergibt sich, daß die Gesamtmenge des im

Chitin vorhandenen Stickstoffes, bei geeigneter Hydrolyse, in Form von Glucosamin nachweisbar ist und daß daneben keine anderen reduzierenden Kohlehydrate auftreten.

## VII. Nachweis der primären Amino-Gruppe im Chitosan.

Wester<sup>2)</sup> hat in seiner früher erwähnten Arbeit darauf hingewiesen, daß es ihm gelungen sei, durch Diazotierung des Chitosans den Stickstoff desselben quantitativ abzuspalten.

<sup>1)</sup> Diese Glucosaminbestimmungen wurden auch durch Polarisation mit einem Lippichschen Polarisator von der Firma Schmidt und Haensch im 20-cm-Rohr nachgeprüft.

(Konzentration des Glucosamins in der Lösung ungefähr 0,2%.)

Es ergaben sich folgende Resultate:

ad 1. Die Lösung zeigte als Mittel von zehn Bestimmungen eine Drehung von  $+0,411^\circ$ , woraus bei Berücksichtigung einer spezifischen Drehung des salzsauren Glucosamins von  $[\alpha]_D^{20} = +72,5^\circ$  (Bioch. Handlexikon 2, 540, 1911) und des spezifischen Gewichtes der Lösung = 1,010,4732 g Glucosamin berechnet wird, entsprechend 88,19%.

ad 2. Die Lösung zeigte eine Drehung von  $+0,364^\circ$ , spezifisches Gewicht = 1,01, daraus berechnet 0,4191 g Glucosamin, entsprechend 82,59%.

<sup>2)</sup> Wester, siehe Anm. 9 auf S. 472.

Da nun dieser Befund beim Chitosan auch für die Konstitutionsaufklärung des Chitins von Bedeutung ist, habe ich es unternommen, nach einem neuen Verfahren, nach der von D. Klein<sup>1)</sup> verbesserten van Slykeschen<sup>2)</sup> Methode, die eine vollkommene Exaktheit bei relativer Kürze der Bestimmungen gewährleistet, eine Überprüfung dieser Angabe vorzunehmen.

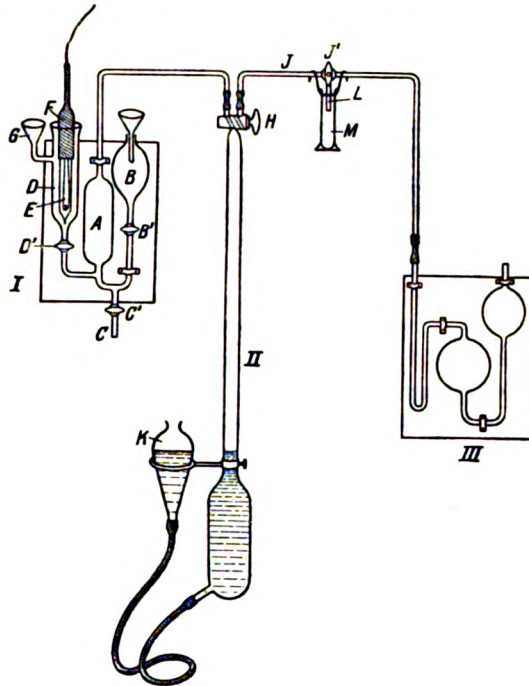


Fig. 3.

Da reines Chitosansulfat nur in heißem Wasser (auf Zusatz von einigen Tropfen Schwefelsäure) löslich ist und beim Abkühlen auf Zimmertemperatur ausfällt, war ich genötigt, bei meinen Analysen eine Heizvorrichtung für die Substanzlösung zu verwenden. Ich benützte dazu, wie Fig. 3 zeigt, eine schmale Röhrenglühlampe (*E*) (matt, Durchmesser 1,5 cm), die an der Stelle, wo sie in die Fassung (*F*) eingeschraubt

<sup>1)</sup> D. Klein, Journ. of Biol. chem. 10, 287 bis 289, 1911.

<sup>2)</sup> Donald D. van Slyke, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, 3170 bis 3181, 1911.

ist, durch einen darübergerzogenen Gummischlauch, der über die Fassung und einen Teil des Leitungsdrahtes geht, vor Feuchtigkeit geschützt ist. Die Substanz wird mit 10 ccm Wasser quantitativ, durch den seitlich angeschmolzenen Trichter (G) in den Meßtrichter (D) gespült und hier nach Eintauchen der Lampe (E) durch die entwickelte Wärme in Lösung gebracht.

Die von mir mit Chitosansulfat ausgeführten Bestimmungen ergaben folgende Resultate:

#### Präparat 1.

1. 0,1888 g Substanz gaben 12,1 ccm Stickstoff; bei  $b = 751$  mm,  $t = 20^\circ$ , daraus berechnet 6,59% Stickstoff.

2. 0,1984 g Substanz gaben 23 ccm Stickstoff; bei  $b = 754,4$  mm,  $t = 20^\circ$ , daraus berechnet 6,55% Stickstoff.

(Bei beiden Analysen ist die in 10 ccm Waschwasser gelöste Stickstoffmenge in Rechnung gezogen.)

#### Präparat 2.

(Mit Verwendung der Heizvorrichtung.)

3. 0,1900 g Substanz gaben 21,3 ccm Stickstoff; bei  $b = 743,2$  mm,  $t = 19^\circ$ , daraus berechnet 6,27% Stickstoff.

4. 0,2014 g Substanz gaben 22,7 ccm Stickstoff; bei  $b = 748$  mm,  $t = 20^\circ$ , daraus berechnet 6,32% Stickstoff.

5. 0,2107 g Substanz gaben 22,9 ccm Stickstoff; bei  $b = 748$  mm,  $t = 20^\circ$ , daraus berechnet 6,09% Stickstoff.

Mittelwert: 6,36% N.

Aus den mitgeteilten Analysen geht hervor, daß der Stickstoff durch die Einwirkung der salpetrigen Säure aus dem Chitosansulfat quantitativ abgespalten wird. (Das gefundene Plus an Stickstoff dürfte sich aus gasförmigen Spaltungsprodukten der Zucker erklären.)

Dieses Verhalten gegen salpetrige Säure spricht nicht gegen die Bindung von Acetylkomplexen an primären Aminogruppen im Chitosan- bzw. Chitinmolekül, da derartige säureamidartige Bindungen ja erfahrungsgemäß leicht einer hydrolytischen Spaltung unterliegen. Dagegen spricht diese Tatsache gegen die Möglichkeit, daß etwa die Stickstoffe untereinander oder mit anderen Teilen des Moleküls durch intramolekulare Bindung verkettet sind. Daraus, sowie aus dem Umstande, daß im Chitinmoleküle keine von Stickstoff und Acetyl freien Kohlehydrate vorhanden sind (was aus meinen Analysen, sowie aus der Auffindung eines



Monoacetylchitosamin durch Fränkel und Kelly hervorgeht), ergibt sich, daß die von Offer für das Chitin aufgestellte Formel und die Annahme einer Amin-Aldehyd-Verkettung der substituierten Zucker den Tatsachen nicht entspricht. Größere Wahrscheinlichkeit besitzt die Annahme von Monocarbonylbindungen nach Art der von Emil Fischer z. B. für Maltose aufgestellten Hypothese.

### Zusammenfassung.

Es sei mir nun gestattet, in der folgenden Tabelle eine Übersicht der Resultate der von mir ausgeführten Analysen des Chitins zu geben:

Analyse	C %	H %	N %	O %	Acetyl %	Glucosamin %	
1	46,58	6,37					Verbrennungen des 2 mal } des 3 mal } gerrein. Chitins.
2	46,61	6,12					
3	46,58	6,62					
4	46,18	—					
5	—	6,48					
6	46,35	6,79					
7	46,12	6,28					
8			6,63				Stickstoffbestimmungen (nach Kjeldahl) des 2 mal } des 3 mal } gerrein. Chitins.
9			6,50				
10			6,88				
11			6,65				
12			6,68				
13			6,79				
14			6,55				
15			6,56				
16					23,65		Acetylbestimmungen (modifiziert nach Wenzel).
17					23,70		
18					22,88		
19					21,47		
20					20,59		
21					22,63		
22						85,08	Glucosaminbestimmungen (nach Kumagawa-Suto). (polarimetrisch).
23						85,54	
24						88,19	
25						82,59	
26						6,59	Stickstoffbestimmungen nach van Slyke (modifiziert von D. Klein), zur Ermittlung des prim. Aminstickstoffes im Chitosansulfat.
27						6,55	
28						6,27	
29						6,32	
30						6,09	
Mittelwerte	46,40	6,44	6,66	40,50	22,5	85,35	
Berechnet für $C_{22}H_{34}N_4O_{21}$	46,26	6,51	6,75	40,48	20,72	86,27	

Anschließend möchte ich die Ergebnisse meiner Untersuchungen folgendermaßen zusammenfassen:

1. Aus der gefundenen Relation

$$N:Acetyl:Glucosamin = 1:1,100:1,0024$$

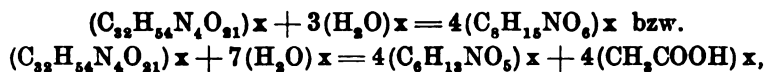
ergibt sich, daß im Chitin auf je ein Stickstoffatom ein Essigsäurerest und ein Glucosamin entfällt.

2. Das Chitinmolekül enthält daher, weder wie Ledderhose, Schmiedeberg und Araki behauptet haben, auf zwei Stickstoffatome drei Acetylc, noch wie Irvine annimmt, auf vier Stickstoffatome drei Acetylc oder, wie Offer angibt, auf zwei Stickstoffatome ein Acetyl, sondern auf je vier Stickstoffatome vier Acetylc.

3. Da im Chitinmolekül, wie ausgeführt, keine von Stickstoff und Essigsäureresten freien Kohlenhydrate vorhanden sind, erscheint die Annahme Offers einer Amin-Aldehydver-kettung eines Glucosamins mit einem Monoacetylglucosamin als nicht den Tatsachen entsprechend.

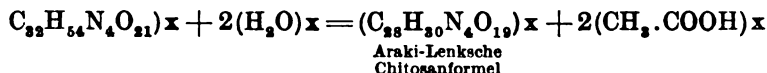
4. In Übereinstimmung mit dem von Lenk bei Analyse des Chitosansulfats gefundenen Ergebnisse, daß im Chitosan mindestens vier Glucosamine verkettet sein müssen, ergibt sich auch aus meinen Analysen die Tatsache, daß aus Monoacetylglucosaminen bestehende Viererkomplexe die kleinsten Bausteine des Chitins bilden.

5. Unter Berücksichtigung meiner analytischen Daten und der in Einklang mit denselben berechneten Formeln vollzieht sich der Abbau des Chitins zu Monoacetylkomplexen resp. Glucosamin und Essigsäure nach der Gleichung:



wo  $x$  eine gerade Zahl bedeutet.

6. Der Übergang des Chitins in Chitosan bei der Kalischnmelze erfolgt unter Abspaltung der Hälfte der in Chitin vorhandenen Essigsäuregruppen nach der Gleichung:



7. Für die Annahme einer Anordnung der Essigsäurereste in Form von Acetessigsäure bzw. Acetylacetatessigsäureresten

ergeben sich keine Anhaltspunkte und dürfte die Annahme einer gleichmäßigen Verteilung der Essigsäurereste auf alle Stickstoffatome am einfachsten und ungezwungensten erscheinen.

8. Durch salpetrige Säure wird der Stickstoff des Chitosans quantitativ abgespalten, was einer säureamidartigen Bindung der Essigsäurereste im Chitosan bzw. Chitinmolekül nicht widerspricht, eine weitere Verkettung von Stickstoffatomen innerhalb des Molekularverbandes jedoch unwahrscheinlich macht.

Die eingehendere Diskussion verschiedener, sich bezüglich der Chitinkonstitution und ihrer Veranschaulichung durch Raumformeln ergebender Möglichkeiten, wie auch eine Erklärung der Entstehung des Chitosans aus dem Chitin behalte ich einer weiteren Publikation vor.

---

# Über die physiologische Wirkung der vier isomeren Piperonyl-acrylsäure-butylamide.

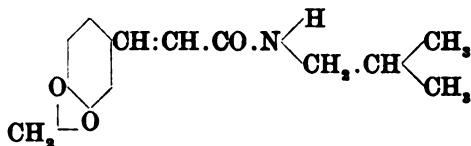
Von

H. Thoms und F. Thümen.

[Mitteilung aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 29. Dezember 1911.)

Wir haben in der Wurzelrinde einer aus Togo uns übersandten und dort als Mittel gegen Frauenleiden viel gebrauchten Rutacee, der *Fagara xanthoxyloides* Lam., einen gut krystallisierenden, bei 119 bis 120° schmelzenden, stickstoffhaltigen Stoff isoliert<sup>1)</sup> und diesen als ein substituiertes Säureamid erkannt, und zwar als ein Piperonyl-acrylsäure-isobutylamid.

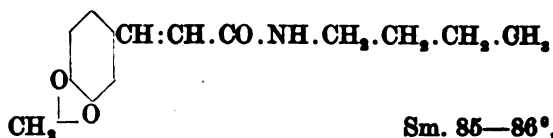


Wir nennen es wegen seines Vorkommens in einer *Fagara*-Art *Fagaramid*. Die Konstitution desselben konnte dadurch festgestellt werden, daß bei der Spaltung mittels 50%iger alkoholischer Kalilauge Piperonyl-acrylsäure und Isobutylamin erhalten wurden. Die Richtigkeit der Konstitution wurde ferner durch die Synthese dieser Verbindung erwiesen.

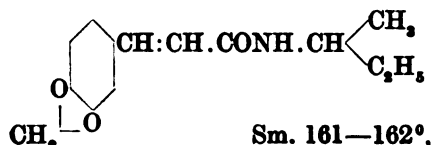
Auf synthetischem Wege haben wir nun auch die drei isomeren Butylamide dargestellt, und zwar

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Dezemberheft 1911.

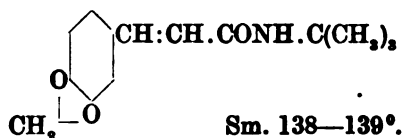
das Normalbutylamid der Piperonyl-acrylsäure:



das Sekundärbutylamid der Piperonyl-acrylsäure:



das Tertiärbutylamid der Piperonyl-acrylsäure:



Es erschien von Interesse festzustellen, ob dem Piperonyl-acrylsäure-isobutylamid diejenigen physiologischen Wirkungen zukommen, wegen deren die Wurzelrinde der *Fagara xanthoxyloides* von den Eingeborenen in Togo arzneilich verwendet wird.

Sowohl Herr Professor Dr. R. Kobert in Rostock i. M. einerseits, wie auch Herr Privatdozent Regierungsrat Dr. E. Rost in Berlin andererseits hatten die Freundlichkeit, eine physiologische Prüfung mit dem Piperonyl-acrylsäure-isobutylamid vorzunehmen.

Die von beiden Herren erzielten Ergebnisse der Prüfung waren vollständig übereinstimmend. Herr Dr. Rost hatte es auch in dankenswerter Weise übernommen, das auf synthetischem Wege gewonnene Piperonyl-acrylsäure-isobutylamid mit dem natürlichen, sowie die drei isomeren Butylamide vergleichend zu prüfen.

Wir sagen den beiden genannten Herren auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank. Die Ergebnisse der von Herrn Professor Kobert ausgeführten Untersuchungen sind in folgendem zusammengefaßt:

I. Das natürliche Piperonyl-acrylsäure-isobutylamid wurde an Fischen in zweierlei Form zu Versuchen verwandt, nämlich als Emulsion mit

Gummi (1:100) und als konzentrierte Lösung in Alkohol, die dann mit Wasser verdünnt wurde. In beiden Fällen war die Wirkung auf Fische dieselbe. Wurde zu 3 l frischen Wassers 0,1 g der Substanz in Emulsion oder in alkoholischer Lösung gesetzt, so waren hineingesetzte Fische, meist *Lenciscus rutilus* von 15 bis 30 cm Länge, stets nach einer Stunde schwer krank, nachdem sie schon lange vorher Abnormitäten des Verhaltens gezeigt hatten, bestehend in Inkoordination der Bewegungen. Nach einer Stunde lagen sie meist wie narkotisiert mit dem Bauche nach oben unbeweglich da. Die Atmung war das einzige Zeichen, daß sie noch lebten. Auf Anfassen reagierten sie kaum noch. Herausgenommen und in frisches Wasser gesetzt, erholten sie sich meist wieder.

In Wasser, das 0,1 g Substanz auf 5 l enthielt, also bei einer Konzentration von 1:50000, trat nach 2 Stunden schwerste Vergiftung auf, ganz unter dem geschilderten Bilde. Herausgenommen erholte sich ein Teil der Fische.

Auch noch bei 1:100000 ist die Substanz für Fische nicht indifferent.

II. Frösche blieben in Lösungen von 0,1 g zu 3 l viele Stunden normal. Natürlich konnten nur Wasserfrösche (*Rana esculenta*) benutzt werden, da Feldfrösche nicht gern so lange im Wasser sitzen. Bei Einspritzung von 2 ccm der 1%igen Emulsion zeigten große Exemplare von *Rana esculenta* keinerlei Erkrankungserscheinungen.

III. Bei Kaninchen (1500 bis 2000 g) verursachten weder 2 ccm, noch 5 ccm, noch 10 ccm der 1%igen Emulsion nach Einspritzung unter die Haut wesentliche Störungen des Wohlbefindens.

Herr Dr. Rost, der die im nachstehenden beschriebenen Versuche ausführte, äußerte sich wie folgt:

Allgemein gesprochen ist zu sagen:

Die Verbindungen könnten als neues Molekül wirken oder sich zersetzen und dann als Amid der aromatischen Säuren oder eher als Butylamide wirken; in letzterem Falle würde eine der  $\text{NH}_2$ -Wirkung entsprechende Krampfwirkung zu erwarten sein.

#### IV. Versuch an Kaulquappen.

0,2 g Substanz wurde in wenig Alkohol gelöst, mit Wasser verdünnt und dann in je 1 l Wasser geschüttet. Sofort wurden jedesmal 12 Kaulquappen (2,5 bis 3 cm lang, teilweise mit voll entwickelten Hinterextremitäten) in die Lösung gesetzt.

Innerhalb 1 bis 3 Minuten verloren die Kaulquappen die Fähigkeit, die normale Lage einzuhalten, legten sich auf die Seite und machten nur noch vereinzelt Bewegungen. Bald stellten die Tiere die spontanen Bewegungen ein, ließen sich beim Umrühren der Flüssigkeit, ohne Widerstand zu leisten, treiben. Bei Reizen führten sie noch mehr oder weniger geordnete Bewegungen aus, endlich wurden sie reaktionslos und lagen wie tot auf dem Boden des Gefäßes. Brachte man die Tiere in frisches Wasser, so erholten sie sich ohne Ausnahme.

Wurde z. B. beim Isobutylamid (synthetisch) und Tertiärbutylamid nach 7 bzw. 5 Minuten die Hälfte der Kaulquappen in frisches Wasser getan, während die anderen 6 noch 19 Minuten in der Lösung verblieben, so erholten sich auch diese Tiere vollständig, wenn sie in frisches Wasser gebracht wurden. Man kann dieselben Tiere zu mehreren solcher Versuche verwenden.

Alle diese Erscheinungen sprechen dafür, daß die vorherrschende Grundwirkung aller Verbindungen bei Kaulquappen die zentrale Narkose ist.

Wurde 0,1 g Substanz in 500 ccm Wasser gebracht, so war die Wirkung auf die 12 Kaulquappen deutlich verlangsamt. Vom Naturprodukt wurde auch 0,05 g in 1000 ccm Wasser geprüft.

Anfänglich zeigten einige Tiere leichte Anzeichen einer Narkose, im Laufe der nächsten Minuten verschwanden sie aber wieder, was mit der allmählichen Abscheidung der Substanz in Beziehung stehen dürfte. Die Unlöslichkeit der Verbindungen in Wasser erschwert überhaupt die Vornahme der Versuche, da bei sämtlichen Lösungen dieser Umstand sich geltend macht. Hatte die Flüssigkeit 6 Stunden gestanden und zeigte Abscheidung der Substanz, so war die Wirkungsstärke ganz wesentlich abgeschwächt.

#### V. Versuche an einem Salamander.

Geprüft wurden Lösungen des natürlichen und synthetischen Isobutylamids, in die die Salamander gesetzt wurden.

Hier machten sich wiederholte eigentümliche Krampfstellungen des ganzen Tierkörpers geltend, das Tier erholte sich vorübergehend, führte auf Reize Bewegungen aus und verfiel wieder in Krampfstellungen. Aber auch hier war die Grundwirkung eine narkotische. Der Salamander erholte sich in frischem Wasser vollständig.

VI. Die Versuche an Fischen (dem dreistachligen Stichling) mit dem natürlichen und dem synthetischen Fagaramid zeigten das typische Bild der Narkose.

#### VII. Versuch an einem Hund (4250 g Gewicht).

0,2 g des synthetischen Isobutylamids, in 3,5 ccm Alkohol gelöst, wurde an vier Stellen unter die Haut gespritzt: keinerlei ersichtliche Wirkung.

Herr Dr. Rost faßte das Ergebnis seiner Versuche in folgende Sätze zusammen:

„Die Grundwirkung aller dieser Substanzen ist die narkotische; sie dürfte eine Wirkung des unzersetzten Moleküls sein. Ob die Krampfstellungen, die beim Salamander beobachtet worden sind, als eine nebenherlaufende Amin- oder  $\text{NH}_2$ -Wirkung aufzufassen sind, läßt sich ohne weitere Versuche nicht entscheiden. Es ist aber durchaus möglich, daß diesen Verbindungen neben der narkotischen auch eine Krampfwirkung zukommt.

Da die Versuche mit denselben Mengen und unter genau den gleichen Versuchsbedingungen angestellt wurden, läßt sich aus dem Umstand, daß der Ablauf der Wirkungen zeitlich gleich verlief, sagen, daß

1. das synthetische Produkt dem natürlichen im wesentlichen gleich wirkt,
2. die übrigen isomeren Butylamide eine mit diesem gleiche Wirkung zeigen.

Die einschlägige Literatur zeigt, daß dieses Ergebnis zu erwarten war:

Die Amide der Fettsäuren (Formamid, Butyramid) haben eine rein narkotische Wirkung<sup>1)</sup>.

Die Amide aromatischer Säuren (Benzamid, Salicylamid) haben ebenfalls eine narkotische, alkoholartige Wirkung<sup>2)</sup>.

Die Amide der aromatischen Säuren, in deren  $\text{NH}_2$ -Rest 1 oder 2 H durch Alkyl substituiert sind, zeigen insbesondere bei größeren Dosen und unter geeigneten Versuchsbedingungen eine Abnahme der narkotischen Grundwirkung und lassen einige gewisse Krampfwirkung in die Erscheinung treten (Nebelthau).

Nach diesen Erfahrungen ist es nicht zu erwarten, daß der Butylsubstituent in den Amiden der aromatischen Säuren eine spezifische Rolle spielt. Daß die Isomeren des Butylrestes die Grundwirkungen der Narkose und eventuell die Krampferscheinungen abändern, ist nicht wahrscheinlich.

---

<sup>1)</sup> F. A. Bucholz (unter Hans Meyer), *Dis. Marburg* 1895.

<sup>2)</sup> Nebelthau (unter Hans Meyer), *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* 36, 451:



# Über den Fettgehalt der Leber einiger Selachier während der Zeit der Schwangerschaft.

## Vorläufige Mitteilung.

Von

Osw. Polimanti.

(Aus der physiologischen Abteilung der Zoologischen Station zu Neapel.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1911.)

Es ist das Verdienst S. Lo Biancos<sup>1)</sup> (S. 670), daß er die Aufmerksamkeit der Forscher auf den Zustand der Leber von *Trygon violacea* Bp. zur Zeit der Schwangerschaft gelenkt hat.

Er wies darauf hin, daß die Leber dieser Tiere während dieser Zeit enorm entwickelt erscheint und die ganze Bauchhöhle einnimmt, während das genannte Organ, wenn die Embryonen ziemlich groß sind, nicht mehr ein solches Volumen zeigt, obwohl seine Dimensionen noch beträchtlich sind. Daraus schließt Lo Bianco, daß wahrscheinlich eine Beziehung zwischen der Leberfunktion und der Ernährung des Embryo existiert.

In den Monaten Juli und August d. J. (1911) hatte ich im Aquarium zu Neapel, als ich Untersuchungen über einige Teile des Zentralnervensystems anstellte, Gelegenheit einige Exemplare von *Trygon* gegen Ende der Schwangerschaft zu beobachten (in der Mucosa zeigten sich die charakteristischen Veränderungen, die bestimmt darauf hindeuteten, daß die Embryonen die Uterushöhle vor kurzer Zeit verlassen hatten). Als ich nun die Leber dieser weiblichen Tiere mit der Leber anderer männlicher Tiere, die fast dasselbe Gewicht hatten, verglich, bemerkte ich schon mit bloßem Auge, daß dieses Organ bei den ersteren nicht nur voluminöser, sondern auch von viel gelblicherer Färbung war.

Dagegen bestanden dem äußeren Anschein nach keine großen Unterschiede zwischen der Leber anderer weiblicher und männlicher Selachier (*Torpedo* mit Embryonen im Uterus und *Scyllium* zu der Zeit, als die Eierablagerung schon beendet war).

<sup>1)</sup> S. Lo Bianco, *Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturità sessuale degli animali del golfo di Napoli*. Mitteilungen a. d. Zool. Station zu Neapel 19, 531 bis 761, 4. Heft, 1909.

Aus diesem Grunde hielt ich es für interessant, Untersuchungen über den Fettgehalt der Leber dieser verschiedenen Tiere anzustellen. Nach Entnahme der Leber aus dem Tiere zerschnitt ich sie sehr fein mit einer Hackmaschine. Von diesem feinen Brei nahm ich eine bestimmte Menge und ließ sie im Brutschrank bei 105° bis zu konstantem Gewicht austrocknen. An dem auf diese Weise ausgetrockneten Brei der Leber machte ich dann die Bestimmung des Gesamtfettgehaltes nach der Soxhletschen Methode, indem ich 24 Stunden lang mit Schwefeläther extrahieren ließ.

Untersuchungen über den Fettgehalt der Selachier hat schon Bottazzi<sup>1)</sup> gemacht, aber ich finde in seiner Arbeit keine Resultate, die ich verwenden könnte, weil das Geschlecht der untersuchten Tiere und auch ihr Gewicht in toto sowie das der Leber der einzelnen Tiere nicht angegeben sind.

Bei meinen Untersuchungen wählte ich immer männliche und weibliche Tiere, die womöglich fast das gleiche Gewicht hatten.

Ich stelle einige der erhaltenen Resultate in Form der nebenstehenden Tabelle zusammen.

Eine Prüfung dieser Tabelle ergibt augenfällig, daß bei den Selachiern eine sehr enge Beziehung zwischen Leber und Schwangerschaft besteht und daß während der letzteren, wie auch kurze Zeit nachher, eine Überladung mit Fett in diesem Organ zu konstatieren ist. Über den Ursprung dieses Fettes müssen wir uns nun Klarheit zu verschaffen suchen.

Dieser ganz besondere Zustand der Leber kann wohl durch Störungen des Kreislaufes im Abdomen bedingt sein, die während der Trächtigkeit eintreten und auch noch eine gewisse Zeit nach Beendigung der letzteren fort dauern. Man könnte an eine Infiltration denken, und in diesem Falle könnte die mikroskopische Untersuchung uns darüber aufklären, ob ein derartiger Vorgang, der immer von der Peripherie nach der Mitte des Organs hin eintritt, in höherem oder geringerem Grade daran schuld ist. Von einer fettigen Degeneration kann man gewiß bei diesem physiologischen Zustand nicht reden.

Endlich könnte man, und vielleicht mit größerem Recht, an eine Fetterzeugung von seiten der Leber (adipogenetische

<sup>1)</sup> F. Bottazzi, Grassi e glucogeno nel fegato dei Selacii. Atti R. Accademia dei Lincei. 1907. Classe scienze fisiche, ecc... Vol. XVI. 2° Sem. p. 514—517. Graisses et glycogène dans le foie des Sélaciens. Arch. ital. de Biol. 48, 1908.

Funktion) denken, und in der Annahme dieser Möglichkeit stimmen alle Physiologen und Pathologen von Bernard und Virchow bis auf unsere Zeit (Deflandre<sup>1)</sup> überein.

	Name und Nummer das Tieres	Dimensionen des Tieres in Zentimetern	Gewicht des Tieres g	Gewicht der Leber g	Prozentgewicht der Leber i. Vergleich zum Gewicht des Tieres g	Fettgehalt der Leber % g	Bemerkungen
Sela- chier ♀	Trygon violacea Bp. I	44 × 52	4025	500	12,422	92,951	Der Uterus ist vollständig leer, aber der Zustand der Mucosa zeigt an, daß die Embryonen seit wenigen Tagen die Uterushöhle verlassen haben.
	Torpedo ocellata Raf. VII	20 × 31	370	19,575	5,290	83,435	Es befinden sich 4 Embryonen im rechten Uterus (Dimensionen v. 25 × 42 bis 28 × 58 mm). Links nichts.
	Scyllium canicula L. X	40	150	11,554	7,702	99,856	
Sela- chier ♂	Trygon violacea Bp. III	35,5 × 45	2660	220	8,270	85,226	
	Torpedo ocellata Raf. V	14 × 22,5	200	10,530	5,265	76,495	
	Scyllium canicula L. IX	39	170	13,550	7,970	90,587	

Nun bleibt uns noch übrig zu untersuchen, welches die Stoffe sind, die diese adipogenetische Funktion der Leber veranlassen.

Man könnte an die Umwandlung der zuckerhaltigen Stoffe und insbesondere des Glykogens in Fett denken, welche Umwandlung auch Bottazzi auf Grund seiner Untersuchungen für die Leber angenommen hat. Diese Funktion wird von allen Physiologen angenommen und wir wissen heutzutage, daß bei gewissen Tieren das Glykogen denselben Prozeß durchmacht wie das Fett und je nach der Periode der Metamorphose variiert. Beide stehen in intimen Beziehungen zur Ernährung und werden oft in denselben Organen bereitet. In dieser Hinsicht muß man an das Knorpelgewebe denken, welches das Skelett dieser Tiere bildet. Erinnern wir uns daran, daß namentlich beim erwachsenen Tiere die Knorpelzellen leicht Fett bereiten, das

<sup>1)</sup> C. Deflandre, La fonction adipogénique du foie dans la série animale. Journ. Anat. Physiol. Paris 40, 73—110, 1904.

in Gestalt von Tröpfchen in ihrem Protoplasma zurückbleibt. Jedesmal, wenn der Knorpel in Wucherung begriffen ist, sieht man an der Stelle des Fettes Zellen, welche mit einer Substanz beladen sind, die alle Merkmale des Glykogens hat (durch Jodtinktur wird sie braun gefärbt).

Diese chemischen und physiologischen Beziehungen lassen es deshalb sehr wahrscheinlich erscheinen, daß Glykogen und Fett sich in einander umwandeln können, und vielleicht bereitet die Leber mit Hilfe dieser Substanz und vermittelt bis jetzt unbekannter chemischer Einwirkungen diese größere Fettmenge bei den Selachiern in der Zeit der Schwangerschaft.

Um bei den Seetieren zu bleiben, denken wir an die Cephalopoden, die, wenigstens nach den glaubwürdigsten Versuchen zu urteilen, kein Glykogen in ihrer Leber haben. Tatsächlich wird das, was Bourquelot<sup>1)</sup> bezüglich der Anwesenheit von Glykogen als Reservematerial in der Leber behauptet, von Frenzel<sup>2)</sup> und Henze<sup>3)</sup> in Abrede gestellt.

Endlich ist zu bemerken, daß Deflandre gerade bei den Cephalopoden die engen Beziehungen zwischen Leber und Geschlechtsdrüsen zur Evidenz nachgewiesen hat und behauptet, das in der Leber befindliche Fett werde zur Zeit der Geschlechtsreife als Reservematerial verwendet.

Auch ich habe konstatiert, daß bei diesen Tieren die Leber im Sommer sehr klein und zusammengeschrumpft ist, während im Frühling (Zeit der Geschlechtsreife) ihr Volumen enorm vergrößert ist.

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß auch bei den Cephalopoden eine sehr enge Beziehung zwischen Leber und Zeit der Geschlechtsreife besteht.

Ausführliche chemische Untersuchungen (vollständige Analyse der Fette, Stickstoff usw.), die ich bei diesen Tieren anzustellen gedenke, wie auch weitere an den Selachiern, werden immer mehr zur Klärung dieser Frage beitragen, die meines Erachtens sowohl an und für sich als auch in allgemein biologischer Hinsicht sehr interessant ist, weil sie uns bezüglich vieler anderer Fragen Aufschluß geben kann. Deshalb hielt ich es für zweckmäßig, durch diese vorläufige Mitteilung, wenn auch in aller Kürze, die Aufmerksamkeit der Forscher auf diese Frage hinzulenken.

<sup>1)</sup> E. Bourquelot, Recherches relatives à la digestion chez les mollusques céphalopodes. C. R. Ac. Sc. Paris. 95, 1174—1176, 1882.

<sup>2)</sup> J. Frenzel, Mikrographie der Mitteldarmdrüse der Mollusken. Nova Acta Ac. Leopold. 48, 81—296, 1886.

<sup>3)</sup> M. Henze, Beiträge zur Muskelchemie der Oktopoden. Zeitschr. f. physiol. Chem. 43, 477—493, 1905.

## Über die Regeneration des Komplements (nach Erwärmung).

Von

M. Gramenitzki (St. Petersburg).

(Aus der Bakteriologischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses  
zu Berlin.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1911.)

Trotz der umfangreichen Literatur über Komplemente überhaupt und über das hämolytische Komplement im besonderen sind die Eigenschaften und die Wirkungsart desselben noch nicht völlig aufgeklärt. Eine der charakteristischsten Eigenschaften ist die Thermolabilität dieser Substanzen. Bekanntlich läßt die Kraft des Komplements selbst bei der Temperatur des Eisschranks (von 6 bis 7°) langsam nach, mit dem Steigen der Temperatur geht der Prozeß der Vernichtung der komplettierenden Eigenschaften des Blutserums sowohl in konzentriertem Zustande als auch in Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung immer rascher und rascher vor sich, während bei der Temperatur von 55 bis 56° die Vernichtung gewöhnlich sehr schnell eintritt. Es wird nun angenommen, daß die Reaktion der Komplementzerstörung nur nach einer Richtung gehe und irreversibel sei.

Die im Nachstehenden angeführten Experimente sprechen jedoch gegen letztere Annahme und bezwecken den Nachweis, daß das Komplement, das bei Erhitzung seine komplettierende Eigenschaft verloren oder teilweise eingebüßt hat, nach dem Erkalten diese Eigenschaft nach Ablauf eines gewissen Zeitraumes wiedererlangt, d. h. sich in dem einen oder dem anderen Grade regeneriert. Es ist hierbei von Regeneration im eigentlichen Sinne des Wortes, von spontaner

Regeneration ohne jede fremde Einwirkung die Rede, die mit derjenigen Reaktivierung erhitzter Sera nichts zu tun hat, die durch Zusatz geringer Quantitäten frischen Serums erzielt und durch das Vorhandensein von Immunkörpern erklärt wird, die bei einer Temperatur von 55 bis 56° nicht zerstört worden sind [Bordet<sup>1)</sup>, Lazar<sup>2)</sup>].

Die Methodik unserer Untersuchungen, die unserer Meinung nach die einfachste und genaueste ist, bestand in folgendem: Wir erhitzen das Komplement und verteilten es nach Abkühlung bis zu einer Temperatur von 37° in einige Portionen, von denen die eine auf komplettierende Kraft unmittelbar nach der Abkühlung untersucht wurde und als Maßstab zum Vergleich mit den übrigen Portionen diente, die bei verschiedener Temperatur mehr oder minder lange stehen blieben. In Anbetracht des Umstandes, daß die übrigen Versuchsbedingungen — Quantität des Blutes und des Amboceptors, Flüssigkeitsmenge und Zeitabstände, innerhalb deren die Bestimmung des in Lösung übergegangenen Hämoglobins vorgenommen wurde — durchaus ein und dieselben waren, konnten wir leicht darüber schlüssig werden, in welcher Richtung die Veränderung der komplettierenden Kraft des Serums beim Stehen vor sich ging, ob sie unverändert blieb, sich verringerte oder vergrößerte. Natürlich konnte bei unseren Beobachtungen auch nicht die Rede davon sein, daß die übrigen Elemente der hämolytischen Reaktion — wir haben den Amboceptor und das Blut im Auge — sich veränderten und dies die von uns erzielten Resultate beeinflusste. Wir möchten somit nochmals mit Nachdruck hervorheben, daß die beim Vergleich der Kraft der Hämolyse unmittelbar nach der Erwärmung und Abkühlung des Komplements bzw. nach einem mehr oder minder langen Stehen desselben erhobenen Befunde sich lediglich auf die Veränderung seiner Eigenschaften und auf nichts anderes zurückführen ließen. Um in unserer Beweisführung vollkommen überzeugend zu sein, lassen wir die qualitativen Experimente, die wir zuvor gemacht hatten, beiseite und möchten nur diejenigen mitteilen, in denen die Quantität des in Lösung übergegangenen Hämoglobins

---

1) Bordet, Annales de l'Institut Pasteur 1901.

2) Lazar, Wiener klin. Wochenschr. 1904.

colorimetrisch bestimmt wurde. Indem wir mittels destillierten Wassers dasselbe Blut der Hämolyse unterzogen, das wir für die Experimente verwendeten, stellten wir nämlich durch Verdünnung eine colorimetrische Skala auf, die Differenzen von 10% zu 10% Hämoglobin aufwies.

Die Hämolyse ging in einem Wasserbade bei 37° (der Apparat ist von Liefmann in der Zeitschr. für Immunitätsforschung 1911 beschrieben worden) in Reagensgläsern vor sich, die zum Zentrifugieren hergerichtet waren, welches letztere natürlich in gleichen Zeitabständen sowohl bei der Prüfung unmittelbar nach der Abkühlung als auch nach mehr oder minder langem Stehen des abgekühlten Komplements vorgenommen wurde. Wir möchten gleich hier bemerken, daß der Fehler bei der Bestimmung der Hämoglobinemengen 5% nicht überstieg.

Was die übrigen Details der Methodik betrifft, so verwendeten wir als Komplement das Serum von Meerschweinchen, als Amboceptor das Serum gegen Hammelblut immunisierter Ziegen und (in der Mehrzahl der Fälle frisch gewonnenes) Hammelblut. Die Anzahl der Amboceptoreinheiten betrug 4 bis 5, die Menge des Blutes 0,5 ccm einer 5%igen Suspension in physiologischer Kochsalzlösung, die mehrere Male vom Serum reingewaschen war. Die Komplementmenge betrug gewöhnlich 0,5 ccm einer 10%igen Lösung mit physiologischem Kochsalzgehalt. Die Gesamtmenge der Flüssigkeit betrug 2,5 ccm. Das Komplement wurde gewöhnlich in frischem Zustande angewendet, einzelne Fälle ausgenommen, die bei der Beschreibung der Versuchsprotokolle besonders gekennzeichnet sind. Die mit nicht angewärmtem Komplement in gleichem Volumen ausgeführte Hämolyse war nach 4 bis 6 Min. komplett. Behufs Vereinfachung der Beschreibung werden wir als „Kontrollbestimmungen“ denjenigen Gang der Hämolyse bezeichnen, der mittels erhitzten Komplements unmittelbar nach dessen Abkühlung ausgeführt wurde; mit diesem verglichen wir dieselben Komplementlösungen nach dem Stehen. Um größere Genauigkeit zu erzielen, wurde die Bestimmung jedesmal doppelt vorgenommen und aus den erhobenen Befunden das Mittel gezogen.

1. Experiment. Komplement in Verdünnung 1:10 in physiologischer Kochsalzlösung (im Erlenmeyerschen Kolben) in einem Volumen von ca. 50 ccm wurde für 7 Min. in ein Wasserbad von 56° versenkt.

Nach Abkühlung bis ungefähr 37° wurde ein Teil desselben in Portionen von je 0,5 ccm mit 1,0 ccm Amboceptor, 0,5 ccm Hammelblut, 0,5 ccm 0,85%iger Kochsalzlösung vereinigt. Ein weiterer Teil wurde bis ungefähr 7° (Temperatur des Eisschranks) abgekühlt und bei dieser Temperatur stehen gelassen. In Zeitabständen, die in der linken Kolonne der Tabelle angegeben sind, wurde die Bestimmung der hämolytischen Kraft im Vergleich zur Kontrolle vorgenommen.

	Quantität des in Lösung übergegangenen Hämoglobins nach			
	10 Min. °/o	20 Min. °/o	30 Min. °/o	40 Min. °/o
Kontrollbestimmung (sofort nach Erwärmen) . . . . .	0	20	40	70
Nach 1½ stündigem Stehen des Komplements bei 7° . . . . .	0	30	60	80
Nach 24 Std. . . . .	20	70	80	100
Nach 48 Std. . . . .	10	40	70	

Dieser Versuch zeigt, daß schon 1½ Stunden nach der Erwärmung und Abkühlung die hämolytische Kraft des Komplements etwas, nach 24 Stunden sehr bedeutend gestiegen, nach 48 Stunden aber wieder gesunken ist.

2. Experiment. Komplement 1:10 in einem Volumen von ca. 20 ccm wurde (im Erlenmeyerschen Kolben) in ein Wasserbad von 57° gebracht, nach Abkühlung bis 37° in drei Portionen geteilt, von denen die eine unmittelbar untersucht wurde, die andere bei 37°, die dritte bei 7° gehalten wurde. Im übrigen blieb die Versuchsanordnung dieselbe.

	Quantität des in Lösung übergegangenen Hämoglobins nach			
	20 Min. °/o	40 Min. °/o	60 Min. °/o	1 Std. 20 Min. °/o
Kontrollbestimmung sofort nach Erwärmen . . . . .	0	10	20	50
Nach 2 stündigem Stehen bei 7° . . . . .	0	20	30	60
„ 37° . . . . .	20	50	70	80
Nach 24 Std. bei 7° . . . . .	20	50	70	80

Der Versuch zeigt, daß die Zunahme der hämolytischen Kraft des Komplements je nach der Temperatur sehr ungleichmäßig war. Bei 37° erreichte die Regeneration bereits nach 2 Stunden die Höhe, die sie bei 7° erst in 24 Stunden erreichen konnte.

3. Experiment. Komplement 1:10 in einem Volumen von ca. 25 ccm (im Erlenmeyerschen Kolben) wurde zwei mal je 4 Min. lang bei 57° er



wärmt. Im übrigen blieb die Versuchsanordnung dieselbe wie in den früheren Experimenten.

	Quantität des in Lösung übergegangenen Hämoglobins nach			
	20 Min. ‰	40 Min. ‰	60 Min. ‰	1 Std. 20 Min. ‰
Kontrollbestimmung . .	0	0	10	20
Nach $1\frac{1}{4}$ stündigem Stehen bei $7^{\circ}$ . . . . .	0	Spuren	10	20
„ $37^{\circ}$ . . . . .	ca. 5	15	20	30
Nach 24 Std. bei $7^{\circ}$ . .	0	10	15	20
bei $37^{\circ}$ . . . . .	0	0	0	Spuren

Dieses Experiment zeigt ebenfalls, wenn auch (infolge des stärkeren Temperatureinflusses) nicht so deutlich wie das 2. Experiment, daß die Regeneration des Komplements in hohem Grade von der Temperatur abhängt, bei der sie beobachtet wird, und daß in der ersten Zeit eine höhere Temperatur günstiger ist, während sie im weiteren Verlauf das Komplement wieder schwächt. Bei niedriger Temperatur geht die Regeneration langsamer vor sich, hält aber längere Zeit an. Mit anderen Worten: bei einer Temperatur von  $37^{\circ}$  sind der wellenförmige Gang des Prozesses und die konsekutive sekundäre Abschwächung der Kraft des Komplements deutlich zu sehen. Einen analogen Prozeß haben wir bereits im ersten Experiment hervorgehoben.

4. Experiment. Komplement 1:10 in einem Volumen von ca. 45 ccm wurde (im Erlenmeyerschen Kolben) für  $6\frac{1}{2}$  Min. in ein Wasserbad von  $56\frac{1}{2}^{\circ}$  versenkt. Im übrigen blieb die Versuchsanordnung dieselbe wie in den früheren Experimenten.

	Quantität des in Lösung übergegangenen Hämoglobins nach				
	10 Min. ‰	20 Min. ‰	30 Min. ‰	60 Min. ‰	1 Std. 30 Min. ‰
Kontrollbestimmung . .	0	0	0	10	50
Nach $3\frac{1}{2}$ Std. bei $7^{\circ}$ . .	0	10	60	80	100
„ „ „ „ $37^{\circ}$ . .	10	30	60	80	
„ 24 „ „ $7^{\circ}$ . .	Spuren	20	40	70	
„ „ „ „ $37^{\circ}$ . .	0	Spuren	10	40	

Aus diesem Experiment ist ebenso wie aus dem vorangehenden der sehr charakteristische und eigenartige Einfluß der Temperatur auf den Prozeß der Regeneration des Komplements, nämlich ein wellenförmiger Verlauf, zu ersehen. Bei höherer Temperatur beginnt die Welle steiler und sinkt rasch wieder. Bei niedriger Temperatur ist der Aufstieg der

Welle und der Abstieg langsamer. Mit anderen Worten: das physikalisch-chemische System, das das Komplement darstellt, erfährt innerhalb eines bestimmten Zeitraumes spontan, ohne jegliche Einwirkungen von außen, eine Veränderung nach zwei entgegengesetzten Richtungen: zunächst findet ein Regenerationsprozeß statt, der (mehr oder minder rasch je nach der Temperatur, wie jede physikalisch-chemische Reaktion) bis zum Gleichgewichtspunkt fortschreitet, in dem die innerhalb einer bestimmten Zeit sich regenerierende Komplementmenge augenscheinlich der Quantität des in Zerstörung übergehenden Komplements gleich ist, worauf der Zerstörungsprozeß Oberhand gewinnt und das regenerierte Komplement seine Eigenschaften wieder einbüßt.

5. Experiment. Komplement 1 : 10 in einem Volumen von ca. 15 ccm wurde (im Reagensgläschen) für 5 Minuten in einem Wasserbade von 57° versenkt. Die Temperatur erreichte im Reagensgläschen gegen Ende des Erwärmens die Höhe von 55°. Sonst blieb die Versuchsanordnung die gleiche.

	Quantität des in Lösung übergegangenen Hämoglobins nach			
	10 Min. %	20 Min. %	30 Min. %	40 Min. %
Kontrollbestimmung . . . .	10	30	70	80
Nach 1 $\frac{1}{4}$ Std. bei 37° . . .	20	80	100	—

Aus diesem Experiment ist gleichfalls das Anwachsen resp. die Regeneration der hämolytischen Eigenschaften des erwärmten Komplements zu ersehen, die bereits nach einem relativ kurzen Zeitraum eingetreten ist.

6. Experiment. Komplement 1 : 10 (24 Stunden im Eisschrank gestanden) in einer Quantität von ca. 10 ccm wurde für 3 $\frac{1}{2}$  Minuten in ein Wasserbad von 56° versenkt. Im übrigen dieselbe Versuchsanordnung.

	Quantität des in Lösung übergegangenen Hämoglobins nach				
	10 Min. %	20 Min. %	40 Min. %	1 $\frac{1}{4}$ Std. %	2 Std. %
Kontrollbestimmung . . . .	0	0	0	Spuren	15
Nach 2 $\frac{1}{2}$ stündigem Stehen bei 37° . . . . .	0	0	20	60	60

7. Experiment. Komplement 1 : 10 (24 Stunden im Eisschrank gestanden) in einer Quantität von ca 10 ccm (im Reagensgläschen) wurde für 3 Minuten in ein Wasserbad von 56° versenkt. Im übrigen Versuchsanordnung wie vorher.

	Quantität des in Lösung übergegangenen Hämoglobins nach				
	20 Min.	40 Min.	1 Std.	1Std.40Min	2 Std.
	%	%	%	%	%
Kontrollbestimmung . . . . .	0	15	15	40	50
Nach 2 <sup>1</sup> / <sub>4</sub> stündigem Stehen bei 37° . . . . .	0	20	40	60	—

8. Experiment. Komplement 1 : 10 in einer Quantität von ca. 10 ccm (im Reagensgläschen) wurde für 4 Minuten in ein Wasserbad von 58<sup>1</sup>/<sub>2</sub>° versenkt. Im übrigen wie vorher.

	Quantität des in Lösung übergegangenen Hämoglobins nach					
	10 Min.	20 Min.	45 Min.	1Std.15Min.	2 Std.	3Std.10Min.
	%	%	%	%	%	%
Kontrollbestimmung . . . . .	0	0	0	0	0	0
Nach 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> stündigem Stehen bei 37° . . . . .	0	0	0	0	0	0

Aus diesem Experiment geht hervor, daß unter den gegebenen Verhältnissen, d. h. wenn nur eine etwas höhere Temperatur angewendet wurde, eine Regeneration des Komplements während der Beobachtung nicht eingetreten ist. Es ist möglich, daß sie beim Fortsetzen der Beobachtung eventuell eingetreten wäre.

Aus den im Vorstehenden wiedergegebenen Experimenten treten mit genügender Deutlichkeit sowohl die Tatsache der Komplementregeneration als auch ihre strenge und gesetzmäßige Abhängigkeit von der Temperatur hervor.

Wir gehen nun zur Besprechung der Frage über, welchen Einfluß die Konzentration des zur Erwärmung gelangenden Komplements auf dessen Wirksamkeit nach der Erwärmung, sowie auch auf die Regeneration seiner Eigenschaften hat. Zur Lösung dieser Frage haben wir folgende Methode gewählt. Wir nahmen eine Reihe von Reagensgläsern von möglichst gleichem Kaliber und gleicher Dicke. In eines der Reagensgläsern brachten wir 1 ccm Meerschweinchenserum, in alle übrigen je 1 ccm desselben Serums, das jedoch mittels physiologischer Kochsalzlösung um das Zehnfache verdünnt war; sämtliche Reagensgläsern wurden gleichzeitig und für ein und denselben Zeitraum in ein Wasserbad von bestimmter Tem-

peratur versenkt, dann abgekühlt. Hierauf wurde das unverdünnte Komplement in einer zehnfachen Quantität physiologischer Kochsalzlösung gelöst, worauf das Experiment den oben beschriebenen Verlauf nahm, d. h. es wurde die Hämolyse unmittelbar nach der Abkühlung des Komplements sowie auch nach mehr oder minder langem Stehen desselben (bei einer Temperatur von 37°) studiert.

9. Experiment. Die Erwärmung wurde auf die soeben beschriebene Art und Weise 3 Minuten lang bei einer Temperatur von 56 $\frac{1}{2}$ ° bewerkstelligt. Im übrigen blieb die Versuchsanordnung dieselbe.

	Quantität des in Lösung übergegangenem Hämoglobins nach				
	15 Min. %	33 Min. %	60 Min. %	1Std.20Min. %	1Std.40Min. %
Kontrollbestimmung:					
unverdünnt . . . .	0	0	0	0	0
verdünnt . . . . .	0	0	Spuren	20	ca. 25
Nach 2 $\frac{1}{4}$ stündigem Stehen bei 37°:					
unverdünnt . . . .	0	0	0	0	
verdünnt . . . . .	0	ca. 35	40	80	

Das Experiment zeigt erstens, daß das unverdünnte Komplement gegenüber der Erwärmung empfindlicher ist als das verdünnte; zweitens, daß eine Regeneration desselben im vorliegenden Falle überhaupt nicht eingetreten ist, trotzdem es sich nach der Erwärmung unter durchaus gleichen Verhältnissen mit der anderen in einer Verdünnung von 1 : 10 erwärmten Komplementportion befand.

10. Experiment. Das Komplement wurde 2 $\frac{1}{2}$  Minuten lang bei 56 $\frac{1}{2}$ ° erwärmt. Sonst alles wie in Experiment 9.

	Quantität des in Lösung übergegangenem Hämoglobins nach			
	15 Min. %	30 Min. %	1 Std. %	2Std.15 Min. %
Kontrollbestimmung: unverdünnt	0	0	0	40
"  verdünnt . . . . .	0	10	75	100
Nach 1 Std. 10 Min. langem Stehen bei 37°:				
unverdünnt . . . . .	0	0	20	—
verdünnt . . . . .	20	70	100	—

Dieses Experiment läßt zwei Folgerungen zu: erstens, daß das unverdünnte Komplement empfindlicher ist gegen die Erwärmung, und zweitens, daß die Regeneration desselben langsamer eintritt im Vergleich zu dem in einer Verdünnung von 1 : 10 erwärmten Komplement.

11. Experiment. Das Komplement wurde für  $2\frac{1}{2}$  Stunden in ein Wasserbad von  $57^{\circ}$  gebracht. Im übrigen war die Versuchsanordnung dieselbe wie in den Experimenten 9 und 10.

	Quantität des in Lösung über- gegangenen Hämoglobins nach	
	15 Min. %	60 Min. %
Kontrollbestimmung: unverdünnt . .	0	20
verdünnt . . .	0	90
Nach 1 Std. 50 Min. langem Stehen bei $37^{\circ}$ : unverdünnt . . . . .	0	30
verdünnt . . . . .	40	100

12. Experiment. Das Komplement wurde für 3 Minuten in ein Wasserbad von  $59^{\circ}$  versenkt. Im übrigen blieb die Versuchsanordnung dieselbe wie in den vorangehenden Experimenten.

	Quantität des in Lösung über- gegangenen Hämoglobins nach			
	20 Min. %	40 Min. %	1 Std. 20 Min. %	2 Std. %
Kontrollbestimmung: unverdünnt	0	0	0	0
verdünnt .	0	0	0	0
Nach $2\frac{1}{2}$ stündigem Stehen bei $37^{\circ}$ : unverdünnt . . . . .	0	0	0	0
verdünnt . . . . .	0	0	0	0

Dieses Experiment bestätigt die bereits oben gemachte Bemerkung, daß eine Temperaturdifferenz selbst von nur  $2^{\circ}$  statt der gewöhnlichen Temperatur von  $56$  bis  $57^{\circ}$  auf die hämolytischen Eigenschaften des Komplements einen sehr großen Einfluß hat. Unter den Bedingungen des Experiments ist weder Hämolyse noch Regeneration des Komplements eingetreten.

13. Experiment. Dieses Experiment bezweckte (es wurde nur einmal ausgeführt) festzustellen, ob und welchen Einfluß die Verdünnung des Komplementes nach dessen Erwärmung auf den Gang der Regeneration hat. In den Experimenten 9 bis 12 wurde das Komplement nach der Erwärmung verdünnt. Jetzt verfahren wir in der Weise, daß wir das unverdünnte Komplement in einem Volumen von ca. 3 ccm 3 Minuten lang bei  $56^{\circ}$  erwärmen. Nach der Erwärmung und Abkühlung wurde dasselbe in drei Portionen geteilt, von denen die eine unverdünnt blieb, die andere um das Zehnfache mittels physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde. Beide wurden für  $4\frac{1}{4}$  Stunde in ein Wasserbad von  $37^{\circ}$  gebracht. Der dritte Teil wurde nach zehnfacher Verdünnung in der üblichen Weise zur sofortigen Kontrollbestimmung verwandt.

	Quantität des in Lösung übergegangenen Hämoglobins nach			
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	50 Min.
	%	%	%	%
Kontrollbestimmung . . . .	10	40	80	100
Nach $4\frac{1}{4}$ stündigem Stehen bei $37^{\circ}$ : unverdünnt . . .	80	100	—	—
verdünnt . . . .	80	100	—	—

Aus diesem Experiment geht somit hervor, daß sowohl das nach der Erwärmung verdünnte Komplement als auch das unverdünnte in gleichem Maße eine Regeneration erfahren hat.

Indem wir die erhobenen Befunde zusammenfassen, glauben wir sagen zu können, daß bei den Temperatureinwirkungen auf das Komplement, die wir anwendeten (nämlich kurzdauernde Erwärmung in einem Wasserbade von  $56$  bis  $57^{\circ}$ ), nach der Abkühlung eine spontane Regeneration des Komplements resp. eine Erneuerung seiner durch die Erwärmung geschwächten Eigenschaften stattfindet. Diese Regeneration tritt nicht plötzlich ein, sondern findet innerhalb eines gewissen Zeitraumes statt; ferner hat die Temperatur, bei der der Prozeß beobachtet wird, auf die Regeneration einen großen Einfluß; bei höherer Temperatur ist ihr Verlauf rascher, dafür aber tritt auch die sekundäre Abschwächung der komplettierenden Eigenschaften früher ein als bei niedriger Temperatur, bei der der Regenerationsprozeß langsamer verläuft. Es werden somit unter den Bedingungen unserer Experimente zwei entgegengesetzt verlaufende Reaktionen beobachtet, so daß erwärmtes Komplement sich eine gewisse Zeit lang gerade entgegengesetzt verhält wie gewöhnliches Komplement, das langsam, aber stetig inaktiviert wird. Ferner geht aus den Experimenten hervor, daß konzentriertes resp. unverdünntes Komplement gegen Temperatureinflüsse empfindlicher ist und sich nur in geringerem Grade regeneriert. Der eigentümliche Prozeß der Regeneration des Komplements findet eine vollständige Analogie in einem anderen Prozeß, den wir erforscht und beschrieben haben<sup>1)</sup> und bei dem

<sup>1)</sup> Gramenitzki, Der Einfluß verschiedener Temperaturen auf die Fermente und die Regeneration fermentativer Eigenschaften. Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, Heft 3 und 4, 1910.

es sich um Regeneration von Fermenten nach Erwärmung handelt. Der Charakter der Erscheinung ist vollkommen ein und derselbe. Ein Unterschied besteht nur in quantitativer Richtung, insofern als für das Komplement Temperaturen über  $56^{\circ}$  verderblich sind, während für gewisse Fermente, beispielsweise für Diastase und Oxydase<sup>1)</sup>, eine Temperatur von  $100^{\circ}$ , in manchen Fällen selbst eine Temperatur von  $115^{\circ}$  keineswegs von zerstörender Wirkung ist. Es tritt bei diesen Fermenten nach einem mehr oder minder langen Zeitraum eine, wenn auch nicht völlige, spontane Regeneration ein. Auch die beiden Spezialfragen, die wir zu erforschen suchten, nämlich die Frage des Einflusses der Temperatur auf den Regenerationsprozeß und diejenige des Einflusses der Konzentration der Lösung bei Erwärmung wurden beim Komplement in ein und demselben Sinne wie für Fermente gelöst.

Was die Erklärung der beschriebenen Erscheinungen betrifft, so sind wir hier in der gleichen Lage wie bei der Erklärung der Erscheinungen der Regeneration (resp. der Inaktivierung) der Fermente. Wir kennen bis jetzt die ohemische Zusammensetzung des Komplements resp. der spezifischen chemischen Gruppe, die die ihm eigentümlichen Wirkungen ausüben, nicht, ebensowenig wissen wir, worin der Prozeß der Inaktivierung bzw. der Regeneration besteht. Man kann bei der Wirkung der hohen Temperatur an einen Dissoziations- oder Dehydratationsprozeß oder an intramolekulare Umstellung der Atome denken; das ist aber nur eine Vermutung, die man auf experimentellem Wege vorläufig noch nicht prüfen kann. Was die physikalische Seite der Frage betrifft, so müssen wir den kolloidalen Charakter der Substanzen, von denen hier die Rede ist, mit Nachdruck hervorheben; bei der Einwirkung hoher Temperaturen können die Kolloide Veränderungen erfahren, die schließlich zur Koagulation mit zahlreichen Übergängen von kolloidaler Lösung zur Koagulation führen [Ostwald<sup>2)</sup>, Landsteiner und Reich<sup>3)</sup>]. Hierbei verringert sich die Angriffsoberfläche der Moleküle und die Oberflächenspannung.

<sup>1)</sup> Bach und Chodat, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **36**, 606, 1903 und Kulpsohn, Dissertation St. Petersburg 1908.

<sup>2)</sup> Wo. Ostwald, Grundriß der Kolloidchemie, 2. Aufl., 1911.

<sup>3)</sup> Landsteiner und Reich, Centralbl. f. Bakt. **35**, 1905.

Je nach der Tiefe und Dauer der Wirkung der hohen Temperatur können diese Veränderungen verschiedene Grade erreichen und in manchen Fällen total und für immer in einen neuen (zu den früheren Reaktionen unfähigen) Zustand, in anderen anscheinend nur teilweise und temporär übergehen; mit anderen Worten: je nach der Intensität der Wirkung der hohen Temperatur kann die Reaktion reversibel und nicht reversibel sein. In diesem Zusammenhang müssen wir auch auf die Arbeiten von Traube<sup>1)</sup> hinweisen. Dieser Autor beobachtete, daß bei der Inaktivierung von Komplement (innerhalb  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{3}{4}$  Stunden bei 56°) die Oberflächenspannung sich bedeutend verringert, bei weniger energischer Erwärmung (beispielsweise bis 40 bis 50°) die Veränderung der Oberflächenspannung nicht so ausgeprägt ist, und es tritt, was von besonderem Interesse ist, nach einem mehr oder minder langen Zeitraum spontan die Norm wieder ein. Darin erblicken wir eine Analogie zu der von uns beobachteten Erscheinung. Wir beabsichtigen, demnächst den Zusammenhang dieser beiden Prozesse zugleich mit anderen Fragen zu studieren, die sich bei der Beurteilung der festgestellten Tatsachen einem alsbald aufdrängen, beispielsweise, ob unter den Bedingungen unserer Experimente die bei der Inaktivierung des Komplements zunehmende Alkalinität der Lösung [Seligmann<sup>2)</sup>] sich zurückbildet, desgleichen wie sich die beiden Bestandteile des Komplements, das Mittelstück und das Endstück, von denen nach den Angaben mancher Autoren [Ferrata<sup>3)</sup>] das Mittelstück thermostabil, nach den Angaben anderer Autoren [Brand<sup>4)</sup>, Guggenheimer<sup>5)</sup>] beide Teile ungefähr in gleichem Maße thermolabil sind, der Regeneration gegenüber verhalten.

Ein anderer Prozeß, an den man bei der Erwärmung des Serums bis 56° und darüber denken kann, ist ein Übergang des Albumins in Globulin. Starke<sup>6)</sup> hat für das Eiweißalbumin

---

<sup>1)</sup> Traube, diese Zeitschr. 1908; Zeitschr. f. Immunitätsforschung 9, 1911.

<sup>2)</sup> Seligmann, diese Zeitschr. 1908.

<sup>3)</sup> Ferrata, Berl. klin. Wochenschr. 1907.

<sup>4)</sup> Brand, Berl. klin. Wochenschr. 1907.

<sup>5)</sup> Guggenheimer, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 11, 1911.

<sup>6)</sup> Starke, Zeitschr. f. Biol. 40, 1901.



nachgewiesen, daß dieses letztere im alkalischen Medium und bei Gegenwart der erforderlichen Quantität neutraler Salze bei Erwärmung auf Temperaturen zwischen 56 bis 100° in eine andere Eiweißmodifikation übergehen kann, die nach allen Reaktionen als Globulin angesehen werden muß. Je größer die Quantität der Neutralsalze und des Alkalis ist, desto höher muß — in den angegebenen Grenzen — die Temperatur sein, wenn die erwähnte Umwandlung stattfinden soll. Ist aber der Salzgehalt gering, so vollzieht sich dieser Übergang schon bei einer Temperatur von 56° sehr rasch. Es liegt die Annahme nahe, daß unter den Bedingungen unserer Experimente dieser Prozeß stattfindet, und zwar nicht in vollem Maße, sondern nur teilweise, so daß die Möglichkeit eines Übergangs in den ursprünglichen Zustand nicht ausgeschlossen ist. Wir sind der Meinung, daß Starke die chemische Seite derselben Erscheinung beschreibt, deren physikalische Seite J. Traube beleuchtet.

Zugunsten der Ansicht, daß bei der Inaktivierung des Komplements der kolloidale Zustand der Substanz eine sehr wichtige Rolle spielt, spricht auch der Umstand, daß unverdünnte Komplementlösungen unvergleichlich empfindlicher gegen die Erwärmung sind, d. h. daß sie unter diesen Bedingungen rascher koagulieren. Hierher gehört augenscheinlich auch die Erscheinung, von der Sachs<sup>1)</sup> berichtet, nämlich daß das Komplement, mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, seine Eigenschaften besser behält als im nicht verdünnten Zustande.

Wie wir gesagt haben, finden die Erscheinung der Komplementregeneration und die Bedingungen, unter denen diese eintritt, ein vollständiges Analogon in der Sphäre der Fermente. Aus der serologischen Literatur steht in gewisser Beziehung zu dieser Frage die Arbeit von Muttermilch<sup>2)</sup>, der bei der Spaltung von Seren, die der Inaktivierung bei 53 bis 57° ausgesetzt waren, beobachtete, daß das mit dem normalen Endstück verbundene Mittelstück stets Hämolyse erzeugte. Ferner gibt das Endstück des inaktivierten Serums mit normalem

---

<sup>1)</sup> Sachs, im Handbuch der Technik u. Methodik der Immunität von Kraus und Levaditi 2, 1909.

<sup>2)</sup> St. Muttermilch, Compt. rend. 70, 577, 1911.

Mittelstück gleichfalls Hämolyse, aber nicht immer. Schließlich tritt, was die Aufmerksamkeit dieses Forschers besonders auf sich gelenkt hat, Hämolyse in einigen Fällen (4 positive Experimente auf 8 negative) durch Verbindung zweier Bestandteile des inaktivierten Komplements ein (die gleiche Erscheinung hebt bei Inaktivierung von Serum durch Lagern bei gewöhnlicher Temperatur Liefmann<sup>1)</sup> hervor). Es drängt sich einem der Gedanke an, ob nicht in dem Muttermilchschen Falle Regeneration der komplettierenden Eigenschaften stattgefunden hat, da eine länger dauernde Dialyse stattfand. Übrigens gibt der Autor nicht an, bei welcher Temperatur die Inaktivierung des Komplements in diesen vier positiven Fällen vor sich ging.

Unsere Angaben können augenscheinlich als weitere Stütze für die Fermenttheorie des Komplements<sup>2)</sup> dienen, da im Prozeß der Wärmeinaktivierung dieser Substanzen vollständige Analogie besteht. Jedoch muß man sich hier großer Vorsicht befleißigen, weil wir nicht wissen, was ein Ferment ist, und was seiner Wirkung zugrunde liegt.

Was die Ansicht Liebermanns<sup>3)</sup> betrifft, der das Komplement als eine Verbindung von Seife mit Eiweißsubstanzen (oder auch mit andern Plasmabestandteilen) betrachtet, so basiert sie u. E. lediglich auf mehr oder minder weitgehenden äußeren Analogien. Auch in unserer Frage konnten wir die Hypothese Liebermanns nicht bestätigen. Wir wählten eine Verbindung von Seife mit Eiweiß (inaktiviertes Serum von Menschenblut), die in einem Volumen von 0,5 ccm bis 1 ccm (d. h. in einem dem Komplement gleichen Volumen) Hämolyse in demselben Zeitabschnitt erzeugte wie unser Komplement, d. h. in 4 bis 6 Minuten; dann wurde die Mischung bei 56° mehr oder minder lange Zeit erwärmt. Schon aus dem Gang und der Tiefe

<sup>1)</sup> Liefmann, 5. Tagung d. Fr. Vereinigung f. Mikrobiologie, Dresden 1911; Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Referate. 4, Beiheft, 1911.

<sup>2)</sup> Liefmann, Centralbl. f. Bakt. 47, 1910. — Liefmann und Cohn, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 6 u. 10, 1910. — Liefmann und Andrew, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 11, 1911. — Rusznyák, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 10, 1911. — Michaelis und Skwirsky, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 7, 1910. — Rondoni, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 9, 1911.

<sup>3)</sup> Liebermann und Fenyvessy, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 10 u. 11, 1911.

der Inaktivierung selbst, die unbedingt statthat, kann man einen deutlichen Unterschied zwischen dieser Mischung und dem Komplement erkennen; gewöhnlich war mindestens  $\frac{1}{2}$  stündige Erwärmung nötig, um die hämolytische Kraft dieser Mischung zu schwächen, in vielen Fällen war sogar eine noch längere Erwärmung erforderlich, wobei die Schwächung der hämolytischen Kraft nicht einmal besonders stark ausgeprägt war. Indem wir den Prozeß weiter untersuchten, überzeugten wir uns, daß eine Regeneration überhaupt nicht stattfindet; in manchen Fällen fand nach Erwärmung und Abkühlung der Mischung von Seife und Eiweiß im Gegenteil eine weitere Schwächung der hämolytischen Kraft statt, d. h. augenscheinlich eine weitere Bindung der Seife durch das Eiweiß (die mit größerer Schnelligkeit bei hoher Temperatur vor sich geht). Beim Prozeß der Inaktivierung und Regeneration des Komplements liegen die Verhältnisse, wie wir gesehen haben, ganz anders.

# Über die Gärung der verschiedenen Weinsäuren.

Von

L. Karczag.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der  
Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

(Eingegangen am 1. Januar 1912.)

Es gibt eine ganze Reihe von Substanzen, die ohne Zugehörigkeit zur Zuckergruppe mit Hefe reichlich Kohlendioxyd entwickeln. Neuberg und Mitarbeiter<sup>1)</sup>, die diese Tatsache aufgefunden haben, bezeichnen sie mit dem Namen „zuckerfreie Hefegärungen“. Das Wesen dieser Erscheinung bildet die Tätigkeit des von Neuberg und Karczag<sup>2)</sup> entdeckten Hefe fermentes, der Carboxylase, welche, die Carboxylgruppen von Carbonsäuren angreifend,  $\text{CO}_2$  abspaltet und so diese in kohlenstoffärmere Verbindungen überführt. Die sich bei der zuckerfreien Hefegärung abspielenden chemischen Vorgänge wurden von Neuberg und Karczag<sup>3)</sup> zunächst an der einbasischen Brenztraubensäure  $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH}$  und an der zweibasischen Oxallessigsäure  $\text{COOH}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$  untersucht, die beide in Acetaldehyd und 1 Mol. bzw. 2 Mol.  $\text{CO}_2$  zerfallen.

In der vorliegenden Arbeit habe ich untersucht, ob die sterisch verschiedenen Modifikationen der Weinsäure sich Hefe gegenüber gleich verhalten, ob sie mit derselben Geschwindigkeit vergären. Zur Untersuchung wurden herangezogen die freien Säuren und deren Kaliumsalze sowie verschiedene Heferasen und Hefedauerpräparate.

<sup>1)</sup> C. Neuberg und A. Hildesheimer, I., diese Zeitschr. 31, 170, 1911. C. Neuberg und L. Tir, II., diese Zeitschr. 32, 323, 1911.

<sup>2)</sup> C. Neuberg und L. Karczag, III., diese Zeitschr. 36, 60, 1911; IV., diese Zeitschr. 36, 68, 1911.

<sup>3)</sup> C. Neuberg und L. Karczag, V., diese Zeitschr. 36, 76, 1911; VI., diese Zeitschr. 37, 170, 1911.

Die Bestimmung der Gärungsgeschwindigkeit geschah mit der Vergleichsmethode, indem gleiche Quantitäten Weinsäuren mit der gleichen Menge derselben Hefe in Schröttersche Gärungsröhren vorsichtig eingefüllt und bei 37° der Gärung überlassen wurden; sodann wurde nach Ablauf gewisser Frist die entwickelte Kohlensäuremenge abgelesen.

Es kamen zur Verwendung 1,5%ige Lösungen der freien Säuren mit den Heferassen D und K.

Die zahlreichen Experimente ergaben, daß die d-Weinsäure besonders im Anfange eine relativ viel kräftigere CO<sub>2</sub>-Entwicklung zeigt als die l-Weinsäure<sup>1)</sup>. Auch wurde bei den meisten Experimenten gefunden, daß die d,l-Weinsäure in der gleichen Zeit weniger CO<sub>2</sub> abspaltet als die d-Weinsäure, und mehr CO<sub>2</sub> als die l-Weinsäure allein. Die Mesoweinsäure oder i-Weinsäure zeigt im großen und ganzen das gleiche Verhalten bei der Gärung wie die d-Weinsäure.

Als Beispiele führe ich an:

Versuch 1.

1,5%ige Lösung der freien Säuren mit Hefe D.<sup>2)</sup>

	Nach 18 Std.	Nach 28 Std.
d . . . . .	1,5 ccm CO <sub>2</sub>	2,0 ccm CO <sub>2</sub>
l . . . . .	Spur " "	Spur " "
d,l . . . . .	0,5 " "	0,5 " "
i . . . . .	2,0 " "	2,5 " "

Versuch 2.

1,5%ige Lösung der freien Säuren mit Hefe K.<sup>2)</sup>

	Nach 18 Std.	Nach 28 Std.
d . . . . .	1,5 ccm CO <sub>2</sub>	2,0 ccm CO <sub>2</sub>
l . . . . .	Spur " "	1,0 " "
d,l . . . . .	0,75 " "	2,5 " "
i . . . . .	1,5 " "	2,0 " "

<sup>1)</sup> Interessanterweise ist die d-Weinsäure physiologisch inaktiver als die l-Weinsäure; siehe: Karozag, Zeitschr. f. Biol. 53, 218, 1909, und auch Buglie e Karozag, Rendiconti d. r. Acc. dei Lincei Roma, Estr. 18, ser. 5a, 2<sup>o</sup> sem., fasc. 10<sup>o</sup>, 474, 1909.

<sup>2)</sup> Bezüglich der selbstverständlich vorgenommenen Kontrollen mit Aufschwemmungen der Hefen nur in Wasser möchte ich auf die auch von Neuberg und Karozag (l. c.) bereits beobachtete Tatsache hinweisen, daß die CO<sub>2</sub>-Produktion der Hefen für sich größer ist als im Gemisch mit verschiedenen Substanzen.

Schließlich wurden die freie d- und l-Weinsäure sowie deren Kaliumsalze mit Hefanol auf ihre Gärbarkeit geprüft, nachdem die meisten Unterschiede gerade bei diesen Modifikationen zutage getreten waren. Es ergab sich, daß Hefanol die freien Säuren überhaupt sehr schwer angreift (so gab z. B. eine 1,5%ige Lösung mit Hefanol nach 24 Stunden nur  $\frac{1}{2}$  ccm  $\text{CO}_2$  sowohl bei d- wie der l-Weinsäure), die Kaliumsalze dagegen, ganz besonders das der d-Weinsäure, relativ leicht vergärt. So z. B. fand ich nach 14 Stunden eine abgespaltene Kohlensäuremenge bei d-Weinsäure von 8,0 ccm, während die l-Weinsäure nur eine Spur  $\text{CO}_2$  aufwies.

Es wurde schließlich auch die verschieden starke Gärbarkeit der d- und l-Weinsäure mit dem Gärungsapparate von Caspari und von der Heyde — den mir die Autoren gütigst zur Verfügung gestellt hatten — graphisch registriert. Auch hierbei gelang mir der Nachweis, daß die d-Weinsäure in der gleichen Zeit mehr  $\text{CO}_2$  abspaltet als die l-Weinsäure.

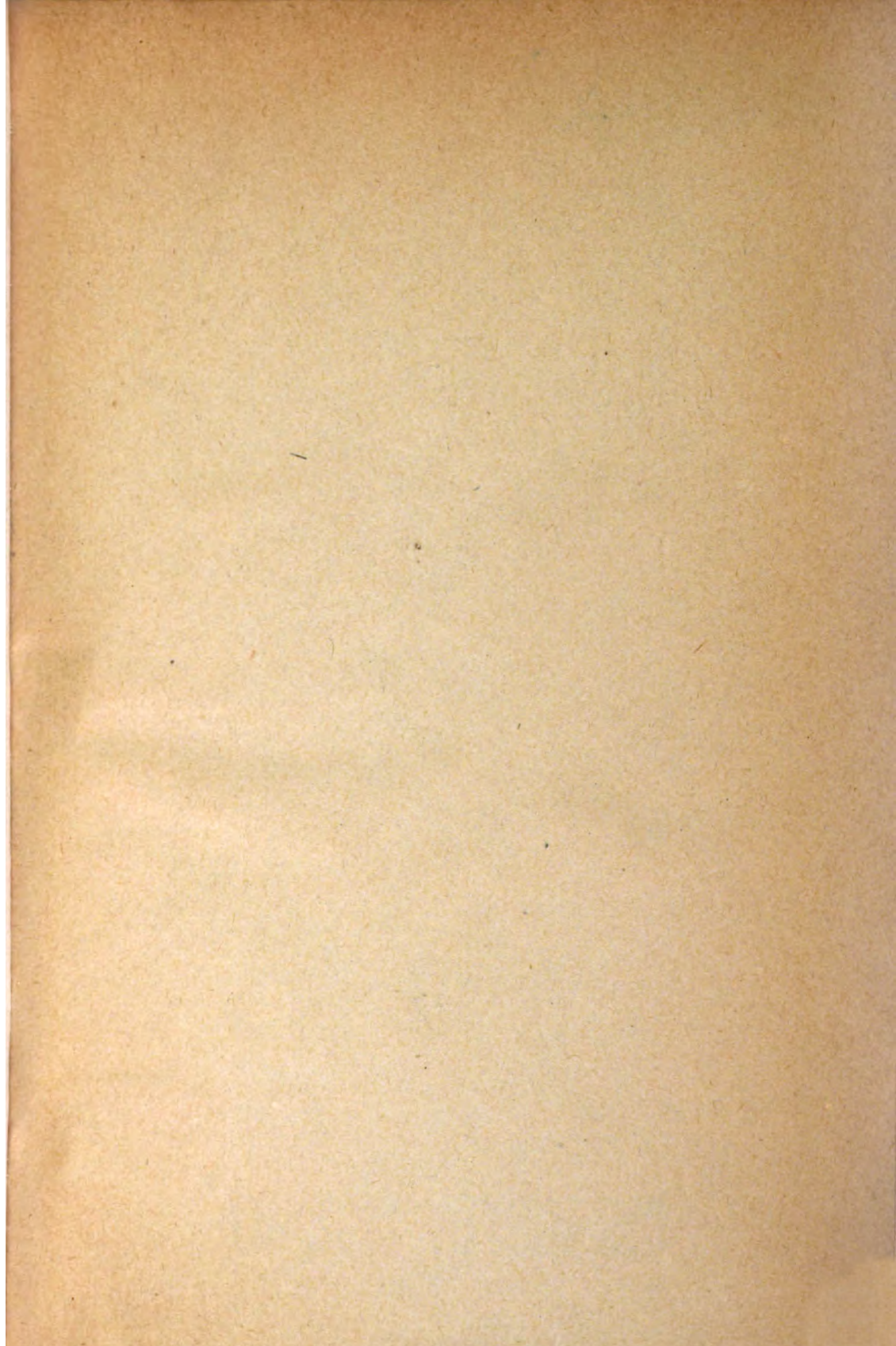
---

## Autorenverzeichnis.

- Bach, A. Zur Kenntnis der Reduktionsfermente. S. 154.
- Bang, Ivar. Über die Verteilung der reduzierenden Stoffe im Blute. S. 166.
- Zur Bestimmung des Harnzuckers. S. 168.
- Battelli, F. und L. Stern. Bemerkungen zur Haupt- und akzessorischen Atmung. S. 163.
- Brach, Hugo. Untersuchungen über den chemischen Aufbau des Chitins. S. 468.
- Brezina, Ernst und Walther Kolmer. Über den Energieverbrauch bei der Geharbeit unter dem Einfluß verschiedener Geschwindigkeiten und verschiedener Belastungen. S. 129.
- v. Csonka, F., siehe Edelstein und v. Csonka.
- Dienes, Ludwig. Zur Frage der individuellen Verschiedenheit der Blutkörperchen. S. 159.
- Doxiades, Leonidas. Über die Glucose des Blutserums. S. 306.
- Edelstein, F. und F. v. Csonka. Über den Eisengehalt der Kuhmilch. S. 14.
- Embden, Gustav und Ernst Schmitz. Über synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber. II. S. 393.
- Feinschmidt, J. Die Säureflockung von Lecithinen und Lecithin-Eiweißgemischen. S. 244.
- Fellner, Hanni. Über synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber. IV. S. 414.
- Fingerling, Gustav. Die Bildung von organischen Phosphorverbindungen aus anorganischen Phosphaten. S. 448.
- Forschbach, J. und J. Severin. Bemerkung zu der Arbeit von K. Reicher und E. H. Stein. S. 344.
- Giemsa, G. Bemerkungen zu der Arbeit von Julius Katz: Über die Ausscheidung des Chinins beim Hunde und über eine neue Methode der quantitativen Chininbestimmung. S. 161.
- Gramenitzki, M. Über die Regeneration des Komplements (nach Erwärmung). S. 501.
- Gröer, Franz von. Über die Prodigiosusgelatinase. S. 252.
- Hári, Paul. Über den Einfluß des Adrenalins auf den Gaswechsel. S. 23.
- Hasselbalch, K. A. und Chr. Lundsgaard. Elektrometrische Reaktionsbestimmung des Blutes bei Körpertemperatur. S. 77.
- Hausknecht, Bella, siehe Minovici und Hausknecht.
- Herlitzka, Amedeo. Über den Zustand des Chlorophylls in der Pflanze und über kolloidales Chlorophyll. S. 321.
- Heubner, W. und H. Rosenberg. Photographische Bestimmung der Intensitätsverteilung in Blutspektren. S. 345.
- de Jager, L. Über den Einfluß von Magnesiumsalzen und Natriumsulfat auf die Harnacidität. S. 294.
- Karozag, L. Über die Gärung der verschiedenen Weinsäuren. S. 516.
- Kolmer, Walther, siehe Brezina und Kolmer.
- Kondo, Kura. Über synthetische Aminosäurebildung in der Leber. III. S. 407.
- Koenigsfeld, Harry. Untersuchungen über die physikalisch-chemischen Grundlagen der Seli-

- wanoffschen Lävuloereaktion. S. 310.
- Loew, Oscar. Über die Giftwirkung von oxalsäuren Salzen und die physiologische Funktion des Calciums. S. 226.
- Lundsgaard, Chr., siehe Hasselbalch und Lundsgaard.
- Minovici, Stephan und Bella Hausknecht. Übereinige Chlor-derivate des Cholesterins. S. 46.
- Obermayer, Friedrich und Robert Willheim. Über formol-titrimetrische Untersuchungen an Eiweißkörpern. I. S. 331.
- Ohta, Kohshi. Über das Verhalten der d-x-Glucoheptonsäure im Organismus des Kaninchens, Hundes und Menschen. S. 421.
- Paladino, Raffaele. Ob und wie die Bestandteile der Gehirns-substanz sich bei normalen Hungertieren verändern. S. 443.
- Parnas, Jakob. Über das Schicksal der stereoisomeren Milchsäuren im Organismus des normalen Kaninchens. S. 53.
- Petry, Eugen. Zur Chemie der Zellgranula. S. 92.
- Polimanti, Osw. Untersuchungen über die Topographie der Enzyme im Magen-Darmrohr der Fische. S. 113.
- Über den Fettgehalt der Leber einiger Selachier während der Zeit der Schwangerschaft. S. 497.
- Puriewitsch, K. Untersuchungen über die Eiweißsynthese bei niederen Pflanzen. S. 1.
- Reicher, K. und E. H. Stein. Bemerkung zur vorausgehenden Notiz der Herren Forschbach und Severin. S. 344.
- Rosenberg, H., siehe Heubner und Rosenberg.
- Schiekele, G. Untersuchungen über die innere Sekretion der Ovarien. I. S. 169.  
— — II. S. 191.  
— Zur Lehre von der inneren Sekretion der Placenta. S. 214.
- Schmitz, Ernst, siehe Embden und Schmitz.
- Severin, J., siehe Forschbach und Severin.
- Siegfried, M. und R. Zimmermann. Über die Bestimmung von Phenol und Parakresol in ihren Gemischen. S. 434.
- Stein, E. H., siehe Reicher und Stein.
- Stern, L., siehe Battelli und Stern.
- Tanaka, Masahiko. Über Kalk-resorption und Verkalkung. S. 285.
- Thoms, H. und F. Thümen. Über die physiologische Wirkung der vier isomeren Piperonyl-acrylsäure-butylamide. S. 492.
- Thümen, F., siehe Thoms und Thümen.
- Vas, Bernhard. Beiträge zur Kreatinin- und Kreatinausscheidung unter pathologischen Verhältnissen. S. 65.
- Weiland, Walter. Beitrag zur Lehre von der Uraminosäurebildung. S. 385.
- Willheim, Robert, siehe Obermayer und Willheim.
- Zimmermann, R., siehe Siegfried und Zimmermann.





100

**CHEMISTRY LIBRARY**



CHEMISTRY LIBRARY

ALF Collections Vault



3 0000 091 476 659