

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-Frankfurt a. M., E. Salkowski-
Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin,
N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Blekel-Berlin, F. Blumen-
thal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien,
P. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-
Wien, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dablen,
H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffer-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, K. Höber-
Kiel, M. Jacoby-Berlin, K. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, P. Landell-Buenos Aires,
L. Langstein-Berlin, F. A. Levine-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York,
W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Ley-Berlin, J. A. Mandel-New York,
L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Nelsenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin,
J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg,
W. Paul-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Roeh-
mann-Breslau, P. Bona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-
Leipzig, S. P. L. Sørensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-
Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., H. v. Tappeler-München, H. Thoms-
Berlin, A. J. J. Vandevelde-Gent, W. Wlechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Sechzigster Band.

Ausgegeben am 27. Februar 1914.



Berlin.

Verlag von Julius Springer.

1914.



QP501
.B58
v. 60

CHEMISTRY LIBRARY



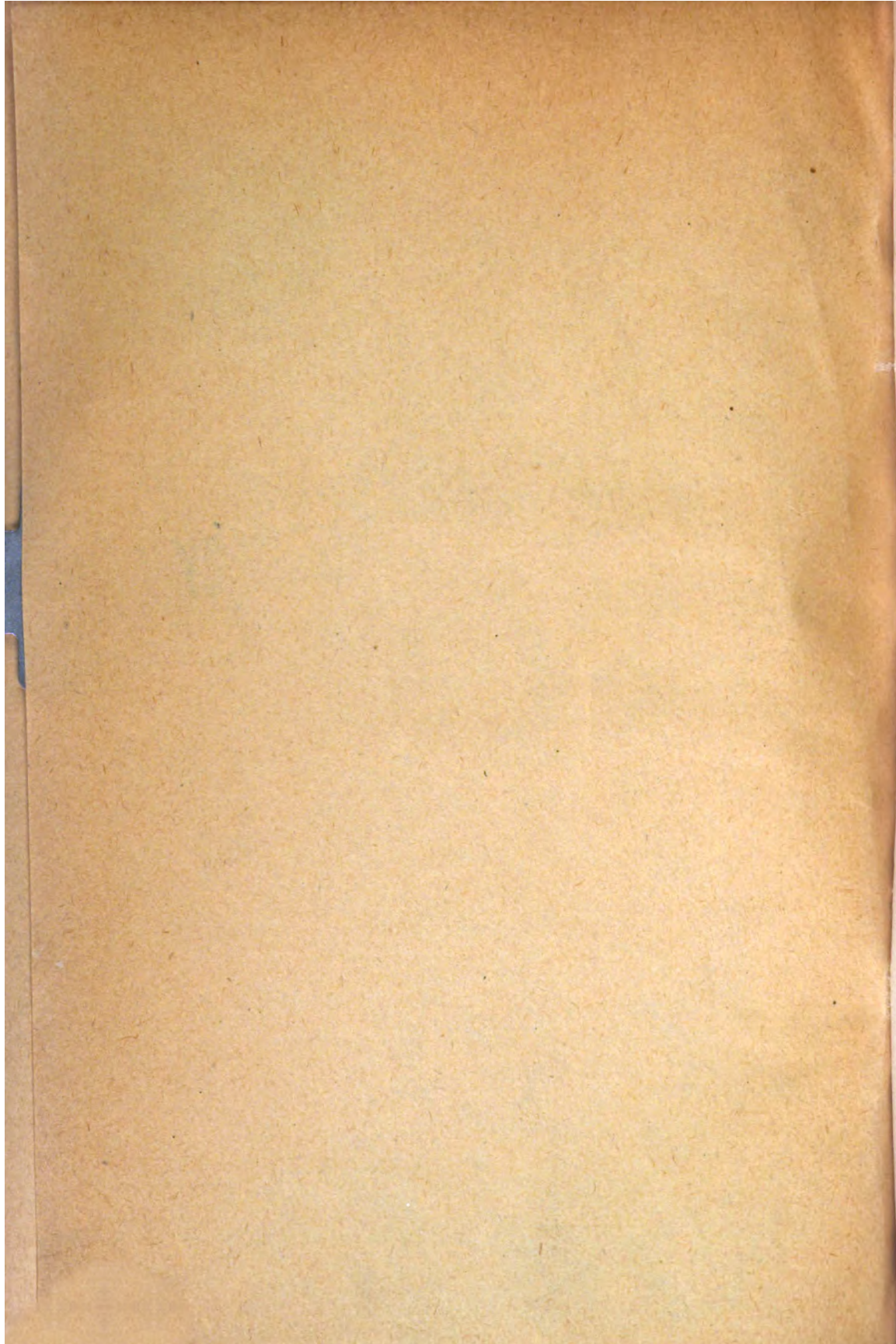
CHEMISTRY LIBRARY

JOURNAL
Does Not Circulate



RY





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-Frankfurt a. M., E. Salkowski-
Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-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. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Hüber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolt-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. 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. Faul-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Rochmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sørensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., H. v. Tappelner-München, H. Thoms-Berlin, A. J. J. Vanderveelde-Gent, W. Wlechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Sechzigster Band.



Berlin.

Verlag von Julius Springer.

1914.

351326

QP501

.B58

v. 60

YTBREVINU ANAKIN
YRASELI

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig

Chem

00 00 1940

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Salus, Gottlieb. Biologische Versuche mit Organplasma	1
Euler, Hans und Harald Cramér. Über die Anpassung von Mikroorganismen an Gifte	25
Schwyzler, F. Einfluß chronischer Fluorzufuhr auf den Chlor- und Calciumstoffwechsel	32
Lénaud, D. Beitrag zur Kenntnis des Pepsins	43
Bernardi, Alessandro. Über das Pepton. I.	56
Michaëlis, L. und P. Rona. Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe. III.	62
Michaëlis, L. und H. Pechstein. Über die verschiedenartige Natur der Hemmungen der Invertasewirkung	79
Michaëlis, L. Zur Theorie der elektrolytischen Dissoziation der Fermente	91
Euler, Hans und Björn Palm. Über die Plasmolyse von Hefezellen.	97
Dreyer, Georges und E. W. Ainley Walker. Kritische Erörterung der Frage der tödlichen Minimaldosis und ihrer Beziehung zum Zeitfaktor	112
Höber, Rudolf und Otto Nast. Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen. I. Hämolysen bei gleichzeitiger Einwirkung von Neutralsalzen und anderen cytolysierenden Stoffen	131
Kozawa, Shuzo. Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen. II. Kataphorese und Hämolyse	146
Löb, Walther. Über die Bildung des Glykokolls aus Oxalsäure	159
Palladin, W. Über die Bedeutung des Wassers bei den Prozessen der alkoholischen Gärung und der Atmung der Pflanzen	171
Vernon, H. M. Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden. II.	202
Bach, A. Über das Wesen der sogenannten Tyrosinasewirkung	221
Kozawa, Shuzo. Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen. III. Artdifferenzen in der Durchlässigkeit der roten Blutkörperchen	231
Doerr, E. und E. Pick. Untersuchungen über ein für die Art nicht spezifisches Eiweißantigen zellulären Ursprunges	257
Gutmann, S. und F. Schlesinger. Über die Bestimmung des Chlors im Blutserum	283
Löb, Walther. Über die Einwirkung der stillen Entladung auf Stärke und Glykokoll	286
Schwyzler, Fritz. Die Geldrollenbildung im Blute vom kolloidchemischen Standpunkte aus	297

	Seite
Schwyzler, Fritz. Die Oberflächenspannung der Leukocyten und deren Beeinflussung	306
Schwyzler, Fritz. Acidose und Anstrengung	310
Pinkus, S. N. Ein neuer Extraktionsapparat	311
Katz, D. A. und D. R. Lichtenstern. Über eine Störung des Kohlen- hydratstoffwechsels nach Laparotomie	313
Izar, Guido. Synthetische Antigene zur Meiostragminreaktion bei bö- artigen Geschwülsten. IV. Einfache und gemischte Glyceride der Myristil-, Linol- und Ricinolsäure	320
Wedemann, W. Über die Schardingersche Formaldehyd-Methylen- blau-Reaktion und einige andere Fermentreaktionen bei Ziegen- milch	330
Kraus, Oscar. Bemerkung zu der Mitteilung von L. Michaelis: „Eine neue Mikroanalyse des Zuckers“	344
Hottinger, Rob. Einige Abänderungen der Methode der Stickstoff- bestimmungen nach Kjeldahl	345
Pawel, E. Ein Beitrag zur Kenntnis des Stoffwechsels während der Narkose	352
Ritter, G. E. Ammonitrat und freie Salpetersäure als Stickstoff- quelle für Schimmelpilze	370
Schloß, Ernst und Leonhard Frank. Tricalciumphosphat als Knochen- bildner beim menschlichen Säugling	378
Morawitz, P. und J. Chandler Walker. Über ein tonometrisches Ver- fahren zur Bestimmung des Gleichgewichtes zwischen Säuren und Basen im Organismus	395
Bieling, R. Experimentelle Untersuchungen über die Sauerstoffver- sorgung bei Anämien	421
Elmendorf, Fritz. Über verminderte Blutalkalescenz bei experimen- teller Urämie	438
Schwyzler, Fritz. Beobachtungen an Leukocyten bei Variationen der Ionenkonzentration	447
Schwyzler, Fritz. Die Rolle der Leukocyten beim Entzündungsphäno- men, ein kontaktelektrisches Problem	454
Wacantig, P. und O. Steche. Über die fermentative Hydroperoxyd- zersetzung. (Zugleich Bemerkung zu der Arbeit von L. Michaelis und H. Pechstein: „Untersuchungen über die Katalase der Leber“)	463
Neuberg, Carl und Ernst Welde. Phytochemische Reduktionen. I. Umwandlung der Nitrogruppe in die Aminogruppe	472
Oertel, W. Über den Einfluß ultravioletter Lichtes auf halogen- sauerstoffsäure Alkalien	480
Neuberg, C. und W. Oertel. Über die Einführung von Phosphorsäure in Aminosäuren, Peptone, Albumosen und Proteine	491
Druckfehler-Berichtigung zu der Arbeit: „L. Michaelis u. P. Rona, Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe. III.“	508
Autorenverzeichnis	509

Biologische Versuche mit Organplasma.

Von

Gottlieb Salus.

(Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 6. Januar 1914.)

Während die antigenen Eigenschaften des Blutserums und der Erythrocyten gut bekannt sind, enthalten die experimentellen Erfahrungen über Organzellen und Organeiweiß viel des Unsicheren und Kontroversen. Die hier der endgültigen Lösung harrenden Fragen sind zunächst die, ob das Organeiweiß biologisch mit dem Blutserum der betreffenden Tierart identisch oder ob es davon deutlich verschieden, also „blutfremd“ sei, wie sich ferner diesbezüglich die verschiedenen Organe eines und desselben Organismus und die gleichen und differenten Organe verschiedener Tierarten gegenseitig verhalten.

Diese Fragestellung hat wesentliches Interesse für den Einblick in komplizierte physiologische und pathologische Probleme; so können wir mit den biologischen Methoden das Nahrungseiweiß von seinem Eintritt in den Verdauungstrakt bis dahin verfolgen, wo es sich als Organeiweiß dem Zellbestand einfügt; auch die biologische Zusammengehörigkeit von Organen und Organgruppen wird mit diesen Hilfsmitteln geprüft. Die Herkunft des Harnereiweißes bei Nierenentzündungen — ob aus Blut oder Nierengewebe — ist seit M. H. Fischers Untersuchungen wieder strittig geworden, ebenso ungeklärt ist die Bedeutung von zirkulierenden Organbestandteilen für den Symptomenkomplex der Eklampsie und der Urämie, die Frage nach der Möglichkeit eines biologischen Beitrags zur Carcinomdiagnose, die Bildung der Autoantikörper usw.

Hier sollen nur die wichtigsten der bisherigen Versuche auf dem Gebiete der Antikörper gegen Organeiweiß kurz be-

sprochen werden, wobei wir von den Cytotoxinen, die zum Teil recht fraglich sind und den pathogenen Wirkungen der cytolytischen Antisera, mögen sie nun direkte oder indirekte sein, bei der großen Unsicherheit, die hier herrscht, vorerst ganz absehen und uns auf jene Ermittlungen beschränken wollen, die mit Präcipitation, Komplementbindung und Anaphylaxie gewonnen werden.

Die wenigen, mit der Präcipitinmethode erlangten positiven Resultate muß man wohl, soweit die Methodik einwandfrei war, voll gelten lassen; doch sprechen die zahlreichen negativen Ergebnisse dafür, daß es im Vergleich zum antigenen Verhalten des Blutserums und nativen Eiweißes der Nahrung große Schwierigkeiten haben muß, präcipitierende Organeiweiß-antisera zu gewinnen. Die Ursachen dafür sind mannigfach; die Notwendigkeit, die Organe möglichst blutfrei zu gewinnen und von anhaftendem Fett- und Bindegewebe zu befreien, besonders aber der Umstand, daß dieses offenbar erst in den Organen neugebildete organ- und artspezifische Antigen für Präcipitinbildung nur in minimalen Mengen vorhanden, im Zellinnern eingeschlossen ist und nur durch Gewaltmaßnahmen, als chemische Zerstörung, mechanische Zertrümmerung unter hohem Druck daraus gewonnen werden kann. Dieses Material enthält aber auch, wenn es ganz klar ist, eine Menge unspezifischen Zellantigens, und die damit von geeigneten Tieren gewonnenen Antisera müssen erst künstlich zur Spezifität geläutert werden, indem man den unspezifischen Anteil, häufig auch zuvor noch einen aufs Blutserum gerichteten, durch Absättigung ausschaltet. Die Spezifität des endlichen Reinsersums läßt in bezug auf seine Intensität (Verdünnbarkeit des Antigens) keinen Vergleich mit den Antiseris gegen Blutsera, Eiereiweiß usw. zu. Auch geht aus allen vorliegenden Versuchen die Notwendigkeit der Einverleibung von großen Mengen Materials, häufiger Injektionen oder der Vorbehandlung in der Tierreihe entfernter Arten hervor, wenn auch nur ein Teil der Tiere brauchbare Sera liefern soll. Wie wir sehen werden, ist der Übergang vom Blut- zum Organeiweiß mit vollem Verlust der antigenen Bluteigenschaften und mit einem starken Absinken und Verflachen antigenener Fähigkeiten überhaupt verbunden; das Organ-

eiweiß ist blutfremd und arm an Antigenen, ganz besonders an spezifischen.

Was die Herstellung des Materials betrifft, so gelingt es ziemlich leicht, durch Durchspülung von den Gefäßen aus die Organe entbluteter Tiere blutfrei zu machen, weit schwerer und nach unseren Erfahrungen unvollständig ist das Resultat bei Leichenteilen, in denen schon Gerinnungen und Senkung des Blutes erfolgt ist. Die Anwendung von Organbrei, der so oft mit immer neuen Mengen physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurde, um dann ausgepreßt oder als Emulsion verwendet zu werden, ist mit enormen Eiweißverlusten verbunden und entwertet das Material bedeutend, abgesehen davon, daß viele Tierverluste durch Infektion und primäre Organgiftigkeit dadurch verursacht werden. Unsere Versuche, die sich auf Präcipitation, Komplementbindung und Anaphylaxie beziehen, wurden daher gerade mit dem leicht in Kochsalzlösung übergehenden Pohlschen¹⁾ Organplasma angestellt, einem leicht darstellbaren, eiweißreichen Antigen, das rasch und daher stets frisch und von Produkten der Autolyse frei gewonnen werden kann, durch Papier filtriert klar ist und das Aussehen von Blutserum — in verdünntem Zustande — darbietet und daher zur Anstellung der betreffenden Reaktionen gut geeignet ist.

Aus der Literatur über Organpräcipitine ist hervorzuheben, daß Weichardt²⁾ Kaninchen wiederholt mit Aufschwemmungen menschlicher Placenta vorbehandelte, das Kaninchenplacentaerum durch Zusetzen von Serum männlicher Individuen und Abzentrifugieren des Präcipitates und Filtration nahezu für Syncytialeiweiß spezifisch einstellen konnte, so daß es dann mit verdünnten Aufschwemmungen menschlicher Placenta (Filtraten), nicht mit Serum präcipitierte. (Allerdings gelang es nicht, im Blute gravider Frauen mit diesem Serum Präcipitate zu erzeugen, was er dadurch erklärt, daß die ins Blut gelangte präcipitable Substanz dort sofort an präcipitierende gebunden wird.)

Forssner³⁾ zerrieb Organe mit reichlicher Kochsalzlösung oder mit $\frac{1}{8}$ ‰ igem Ammoniak zu Brei, filtrierte durch doppeltes Filterpapier und zentrifugierte dann. Er injiziert 6 bis 8 mal, verwendet für jede Injektion die Emulsion einer Meerschweinchenniere oder entsprechende Stücke Leber, Milz. Das Antigen war offenbar nicht blutfrei. Er findet durch Absättigung, daß z. B. ein Antinierenserum einen gemeinsamen

¹⁾ J. Pohl, Das Arbeiten mit Organeiweiß. Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden von E. Abderhalden.

²⁾ Weichardt, Über die Syncytiotoxine. Hyg. Rundschau 1913, 491.

³⁾ Forssner, Münch. med. Wochenschr. 1905, 892.

Anteil für das Normalserum, Leber, Milz, Niere dieser Tiere haben, einen anderen für Leber und Niere, einen dritten für Niere allein. Das nach Zusatz von Leber, Milz oder Normalserum gewonnene Zentrifugat reagiert noch mit Niere, dagegen reagiert das mit Niereneiweiß versetzte Antiserum nach Abzentrifugieren des Niederschlags nicht mehr mit einem der anderen Filtrate.

Grund¹⁾ verwendete Preßsäfte der Buchnerschen Presse, die $4\frac{1}{2}$ bis $11\frac{1}{2}$ % Eiweiß enthielten; die Trennung von Blut- und Organeiweißpräcipitinen gelang ihm leicht; schwieriger war es mit der Trennung der Organsäfte gegeneinander; so konnte er von vier Nierenantisera nur eines gegen Leberpreßsaft spezifisch machen (da die verschiedenen Eiweißkörper derselben Tierart teils gemeinsame, teils spezifische Receptoren haben und gegen beide Präcipitine gebildet werden, so muß man zunächst die gegen erstere gerichteten Präcipitine durch Absättigung binden, um die spezifischen frei zu machen).

Artspezifische Präcipitine gegen Muskeleiweiß sind von Horiuki²⁾ dargestellt worden. Einige Autoren (Cesaris-Demel und Sotti, Fiessinger, Fleischmann und Davidsohn, Grund) fanden aber, daß die Organzellenantisera nicht bloß in bezug auf das Organ, sondern auch in bezug auf die Art unspezifisch sein können, daß dagegen die Serumantisera nur in geringem Maße Antikörper gegen Organzellen enthalten. Es ist also schon hier in bezug auf die Präcipitation von verwandtschaftlichen Beziehungen der Organe der gleichen und verschiedener Spezies die Rede, und Röbke³⁾, bei dem sich ausführliche Literaturangaben finden, resümiert, es scheine auf keine Weise zu gelingen, wirklich spezifische Antikörper gegen Organe zu erzielen, wenn man auf chemische Eingriffe in das Antigenmaterial verzichte.

Für unsere eigenen Versuche ist noch die Angabe von Grund zu vergleichen, daß es nicht die Nucleoproteide sind, denen das Antigen für Präcipitinbildung angehört.

Bekannt ist endlich, daß von Uhlenhuth⁴⁾ die Organspezifität des Linseneiweißes zunächst durch Präcipitation festgestellt wurde.

Mittels Komplementbindung untersuchten die Frage der Organantikörperbildung u. a. Michaelis und Fleischmann⁵⁾ (1906). Sie bekamen komplementbindende Amboceptoren für Leber, die jedoch auch mit anderen Organen der nämlichen Tierart reagierten. A. Schütze⁶⁾ konnte bei einem Hunde nach 5 Monate lang fortgesetzter subcutaner Behandlung mit Hammelschilddrüsenextrakt Komplementbindung mit

¹⁾ Grund, Über organspezifische Präcipitation und ihre Bedeutung. Deutsch. Arch. f. klin. Med. 87, 148 ff., 1906.

²⁾ Horiuki, Münch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 17.

³⁾ R. Röbke, Fortschritte der Cytotoxinforschung. Lubarsch-Ostertag 13, 2.

⁴⁾ Uhlenhuth, Deutsche med. Wochenschr. 1901, 82.

⁵⁾ Michaelis und Fleischmann, Zeitschr. f. klin. Med. 58, 463, 1906.

⁶⁾ A. Schütze, Zeitschr. f. klin. Med. 65, 383, 1908.

Hammelschilddrüse (0,1 Extr. = volle Kuppe, 0,05 Extr. = leichte Kuppe, also recht bescheiden), aber auch mit Niere, Hoden, Nebenhoden, Bauchspeicheldrüse, Milz vom Hammel erhalten, alle gleich stark; dagegen versagten die gleichen Organe vom Menschen als Antigen mit diesem Hundeserum. Halpern¹⁾ vermochte nach intraperitonealer Einverleibung operativ entfernter und fein zerriebener körpereigener Organe bei Hunden Antikörper zu erzeugen, die im Komplementbindungsversuch mit den homologen Organen Hemmung der Hämolyse bewirkten. Diese Antikörper waren teilweise organspezifisch, zum Teil war die Organspezifität keine strenge; bis auf 3 Fälle fehlte auch die Artpezifität. Nakano²⁾ bekam manchmal von Meerschweinchen, die dreimal intraperitoneal mit Menschenleber injiziert worden waren, Sera, die mit Extrakten verschiedener Organe des Menschen, aber auch des Kaninchens und mitunter selbst des Meerschweinchens reagierten. Es ist interessant, daß gerade das für Serumantikörper so geeignete Kaninchen für Organeiweiß im Stiche läßt, während auch wir mit dem für Serum unbrauchbaren Meerschweinchen positive Resultate für Organplasma erhielten. Also auch da ein Gegensatz beider Eiweißarten. Spärlich und widerspruchsvoll sind die Versuche, mit Hilfe der Anaphylaxie die antigenen Fähigkeiten des Zelleiweißes zu ergründen. So wurde von Ohkubo, der allerdings bloß die intraperitoneale Probeinjektion in Verwendung zog, die Meinung ausgesprochen, daß die anaphylaktische Sensibilisierung nur von der Blutbeimengung herrühre und daß man Meerschweinchen mit blutfreien Organextrakten überhaupt nicht in den Zustand der anaphylaktischen Bereitschaft versetzen könne. Auch Dörr³⁾ ist zu Zweifeln geneigt, wenn er nun (Kolle-Wassermann II. Aufl.) sagt: „Der Nachweis dieser Verhältnisse mit Hilfe des anaphylaktischen Experiments ist aus mehrfachen Gründen erschwert; einerseits sind die Differenzen zwischen Serum- und Organeiweiß oder zwischen verschiedenen Organeiweißarten desselben Tieres nicht immer so beträchtlich, daß sie bei Anwendung der gangbaren Methoden immer so beträchtliche Ausschläge geben, andererseits ist es schwer möglich, die Organzellen frei von Serumeiweiß zu bekommen, das schon in infinitesimalen Mengen sensibilisierend auf das Meerschweinchen wirkt und die organspezifische Überempfindlichkeit deckt.“ Indes sei hervorgehoben, daß es auch für den anaphylaktischen Versuch eine Art der Absättigung in vivo gibt, wie sie zuerst von Uhlenhuth angewendet wurde.

Wir wollen unter den Organen zunächst von der Augenlinse absehen, deren Blutfremdheit und Organspezifität weniger überrascht, die von Uhlenhuth durch die Präcipitinreaktion, dann von Dörr, Krusius, Uhlenhuth durch den Anaphylaxieversuch festgestellt wurde; sie

¹⁾ Halpern, Experimentelle Studien über Antikörperbildung usw. Zeitschr. f. Immunitätsforschung 11, 609, 1911.

²⁾ H. Nakano, Untersuchungen über das Wesen der Wassermannschen Reaktion. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 76, 1913.

³⁾ R. Dörr, Anaphylaxie, in: Kolle-Wassermann, II. Aufl.

konnten auch folgerichtig das eigene Tierindividuum damit sensibilisieren und reinjizieren; ebenso wollen wir absehen von den Geschlechtsdrüsen und den zu ihnen in Beziehung stehenden Organen, denen Dunbar, Götzl¹⁾ u. a., ersterer auf Grund lokaler, letzterer auf Grund allgemeiner Anaphylaxieerscheinungen eine relative oder absolute Spezifität des Kreises der Geschlechtsorgane zusprechen.

Hertle und Pfeifer²⁾ wuschen fein verriebenen Organbrei 3 bis 6mal in der Zentrifuge mit immer neuer Kochsalzlösung, injizierten 3mal große Mengen des Materials und warteten 40 Tage mit der Probeinjektion. Sie benützen als Kriterium den Temperaturabfall. Nach ihnen gelingt es, durch wiederholte Behandlung von Meerschweinchen mit Meerschweinchenniere eine Überempfindlichkeit gegen dieses Organ zu bewirken. Wurden die Tiere mit Nebenniere oder Hoden von Meerschweinchen sensibilisiert, dann waren sie ebenso, wenn auch nicht gleich stark überempfindlich gegen Meerschweinchenniere, aber nicht gegen das Organeweiß der Vorbehandlung³⁾.

Durch Zertrümmerung einer Niere des Meerschweinchens, nicht aber des Kaninchens, und Reposition des Gewebes gelang es, bei Wiedereinspritzung von artgleicher Nierenemulsion beträchtliche Grade von Überempfindlichkeit nachzuweisen.

Guerrini⁴⁾ arbeitete mit Nucleoproteiden; auch er wäscht die blutfrei gespülten und zerschnittenen Organe wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung, trocknet dann die Stückchen zwischen Filterpapier, zerreibt sie im Mörser zu feinem Brei und setzt das 20fache Volumen an 1%igem Ätzkali zu, läßt 24 Stunden unter Schütteln im Eisschrank stehen, sedimentiert, zentrifugiert die überstehende Flüssigkeit. Dann setzt er 1%ige Essigsäure bis zum Eintreten der sauren Reaktion zu. Das gefällte Nucleoprotein wird auf dem Filter gesammelt und im Vakuum getrocknet (Pferdemilz und -leber, Hundemilz und -leber). Die Reinjektion erfolgt stets ins Peritoneum. Nach ihm ist die durch das Gewebsnucleoprotein hervorgerufene Reaktion spezifisch für ein und dasselbe Organ eines und desselben Tieres. In seltenen Fällen kann eine, aber stets schwache Reaktion durch ein anderes Organ desselben Tieres ausgelöst werden, nie durch das Nucleoprotein des gleichen Organs einer fremden Tierart. Also strenge Art- und mäßige Organspezifität. Hier ist zunächst daran zu denken, daß die Artspezifität durch geringen Blutgehalt bedingt sein könnte und daß durch die Vorbereitung ein starker Antigenverlust erfolgt sei — sind doch unsere Kochsalzextrakte schon nach $\frac{1}{2}$ stündiger Extraktion sehr eiweißreich gewesen, endlich scheint die Essigsäurefällung dem Antigen nicht zuträglich zu sein, ab-

¹⁾ A. Götzl, Verhdl. d. IV. Kongresses d. deutsch. Ges. f. Urologie.

²⁾ Hertle und H. Pfeiffer, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 10, Nr. 5/6; ebenda: Weitere Beiträge.

³⁾ Kann wohl schwerlich auf etwas anderem als auf Antigenarmut dieses Gewebematerials beruht haben.

⁴⁾ G. Guerrini, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1912, 70.

gesehen davon, daß die peritoneale Reinjektion nicht ausschlaggebend genug ist. Jedenfalls wäre stets bei Vergleichen der Eiweißgehalt der einzelnen Präparate zu bestimmen.

Unter diesen Umständen, bei der Ungleichmäßigkeit des verwendeten Materials, der Verschiedenheit der Versuchstechnik und der Inkonstanz der Resultate schien es zweckmäßig, die ganze Frage nochmals an möglichst einheitlichem, unverändertem Organeiweißmaterial zu untersuchen. Dazu eignete sich das J. Pohlsche „Organplasma“ besonders gut; dann bleibt noch die Prüfung des unlöslichen Anteils der Organzellen auf Antigene übrig, während eine solche Trennung der einzelnen Anteile — außer bei Guerrini — bisher nicht vorgenommen wurde. Das Organplasma wurde zumeist als frischer Kochsalzextrakt aus Hackbrei oder auf dem Drahtsieb zerriebenen Stückchen tunlichst blutfrei gespülter Organe verwendet; er stand zumeist 24 Stunden im Kasten des Eiserzeugungsapparates, bei längerer Extraktion erfolgte Toluolzusatz, doch genügte oft $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde, um eiweißreiche Flüssigkeiten zu bekommen. Wiederholt durch Papier filtriert, war das Plasma vollkommen klar, sein Eiweißgehalt schwankte je nach der verwendeten Menge der Kochsalzlösung zwischen 0,75 bis 10 p. m. Esbach.

Die sofort wieder in Kochsalz gelösten Niederschläge von 0,2% iger Essigsäure und die Trockenpulver nach Wiechowski¹⁾, die für die Konservierung zu chemischen Zwecken so gute Dienste leisten, und die rasche Herstellung klarer Lösungen gestatten, schienen den frischen Organplasmen für biologische Versuche etwas nachzustehen, wie überhaupt der chemische und biologische Begriff der Denaturierung grundverschieden sind. Bemerkenswert ist, daß von unseren Plasmen (Niere, Muskel, Leber verschiedener Arten) bloß ein goldgelbes Hühnerleberplasma — vielleicht wegen seines Gallegehaltes — für Meerschweinchen per venam primär giftig war, alle anderen wurden bei dieser Applikation in den verwendeten Mengen anstandslos vertragen. Einigemal gelangten auch nicht filtrierte Extrakte (Emulsion) zur Verwendung.

Der von Pohl wegen seiner Beziehungen zum Protoplasma und der Homologie zum Blutplasma als „Organplasma“ be-

¹⁾ Wiechowski, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 9, 240, 1907.

zeichnete Kochsalzauszug gibt nach ihm sämtliche Farben- und Fällungsreaktionen der Eiweißkörper. Wenn auch zwischen Muskeln und Parenchymorganen deutliche Unterschiede bestehen, so ähneln doch die Organplasmen in vielem den durch ein gleiches Verfahren hergestellten Muskelplasmen.

Der aus dem Organplasma dargestellte „Essigsäurekörper“ ist optisch inaktiv, koaguliert im nativen Plasma und aus alkalischer Lösung bei 38 bis 39° oder darunter. Seine Koagulationsfähigkeit, die fast restlose Verdaulichkeit, Ausfällbarkeit durch schwache Säuren, Ungiftigkeit per venam ließen ihn zunächst als Globulin erscheinen, doch ließ sich darin eine Pentose und nach Salzsäurehydrolyse ein Purinkörper nachweisen. Der Essigsäurekörper ist chemisch ein Nucleoproteid; neben ihm ist im Organplasma noch ein zweites, davon etwas differentes Nucleoproteid enthalten. „Fasse ich zusammen, so ergibt sich, daß die löslichen Organeiweißkörper . . . toto coelo vom Blutserum verschieden sind.“

Versuche.

Kaninchen I: Kochsalzplasma von Meerschweinchennieren, subcutan am 2., 7., 12., 18., 25. IX. (5 Injektionen). Verblutet am 1. X. 1918.

a) Verhalten des Organplasmas in bezug auf das hämolytische Antigen der Meerschweinchenorgane.

Kaninchen- serum I ccm	Auf physiol. Kochsalz- lösung	5% Hammel- erythrocyten	Komplement in 1 ccm physiol. Koch- salzlösung	Lösung der Erythrocyten
0,1	1	1	0	0
0,1	1	1	0,05	komplett
0,01	1	1	0,05	"
0,005	1	1	0,05	"
0,001	1	1	0,05	"
0,0005	1	1	0,05	0

b) Giftigkeit dieses inaktiven Kaninchenblutserums (I) für Meerschweinchen von ca. 350 g per venam.

M. 1 bekommt 1,8 ccm Ks. I. Nach 8 Minuten anaphylaxieartige Erscheinungen, Tod unter Krämpfen nach weiteren 7 Minuten (Lungenblähung).

M. 2 bekommt 1 ccm Ks. I. Dasselbe ohne wesentlichen Zeitunterschied.

M. 3 bekommt 0,5 ccm Ks. I. Krank, paretisch, Kot- und Harn-
abgang, nach 1 Stunde erholt.

M. 4 bekommt 1,0 ccm Ks. normal. }
M. 5 " 0,6 " " " " } Reaktionslos.

c) Präcipitinversuch Ks. I mit Organplasma von Meerschweinchen-
nieren und mit solchem von Menschennieren und Verdünnungen der-
selben negativ.

d) Komplementbindungsversuch mit diesem Ks. I in Mengen von
0,1 und mit Meerschweinchen-, Kaninchen- und Menschennierenplasmen
(je 0,1, 0,05, 0,01, 0,005) negativ. Da dies am Hämolysegehalt des
Ks. I liegen konnte, wurde in einem weiteren Versuch das Serum zuerst
mit Hammelerythrocyten erschöpft, doch trat auch diesmal keine Kom-
plementbindung auf.

Der hämolytische Titer (0,001) von Ks. I war bereits bei der
Probenahme nach der dritten Injektion in gleicher Stärke ermittelt
worden.

Ergebnis: Kaninchen Serum nach 5 maliger Vorbehandlung mit
Meerschweinchennierenplasma hat Hämolyse für Hammelblutkörper-
chen, ist per venam für Meerschweinchen giftig, zeigt mit klaren homo-
und heterologen Nierenorganplasmen weder Komplementbindung noch
Präcipitation.

Kaninchen II. 8 mal subcutan vorbehandelt mit Meerschwein-
chennierenemulsion rasch hintereinander (17., 18., 20., 22., 24., 27. X.,
4. und 10. XI.). Verblutet 18. XI.

Inakt. Ks. II ccm	In physiol NaCl	5% Hammel- blutkörperch.	Komplement in 1 ccm physiol. NaCl	Lösung der Erythrocyten
0,01	1	1	0	0
0,01	1	1	0,05	komplett
0,001	1	1	0,05	"
0,0005	1	1	0,05	"
0,0001	1	1	0,05	komplett in 30 Minuten
0,00005	1	1	0,05	0

Präcipitation:

0,1 Ks. II mit	0,1 0,01 0,001 0,0001	} Meerschweinchen- nierenplasma in 1 ccm Kochsalz- lösung }	} negativ		
0,1 Ks. II mit	0,1 0,01 0,001 0,0001			} Kaninchennieren- plasma in 1 ccm Kochsalzlösung }	} negativ

¹⁾ Forssman und Hintze, diese Zeitschr. 44.

**Komplementbindung. Unterhemmende Antigenosen austitriert.
1 Stunde bei 37°.**

Antiserum inaktiv K. II	Komplement zusammen mit 2 ccm Kochsalzlösung	Antigen Meerschwein- chennieren- plasma	5% Hammel- erythrocyten sensibilisiert ccm	Lösung
0,1	0,075	0	1	komplett
—	0,075	0,1	1	"
0,1	0,075	0,1	1	"
0,1	0,075	0,01	1	"
0,1	0,075	0,001	1	"
0,1	0,075	0,0001	1	"
—	0,075	—	nicht sensib. 1	0

Der gleiche Versuch mit Kaninchennierenplasma ebenfalls negativ. Ebenso der ganze Versuch, nachdem das Ks. II (2 ccm mit 1 ccm Hammelblut 1 Std. bei 37°, dann abzentrifugiert) vom Hämolytin befreit worden war. (Jetzt hemmt 0,1 Ks. II allein, 0,05 gibt negative Komplementbindungsergebnisse.)

Ergebnis: Mit Meerschweinchennierenemulsion 8 mal in kurzen Intervallen vorbehandelt. Hämolytintiter 0,0001. Weder Präcipitation noch Komplementbindung mit Organplasmen.

Kaninchen III. 4 mal rasch hintereinander je 4 ccm Meerschweinchennierenemulsion subcutan (17., 18., 20., 22. X.). Verblutet am 31. X.

Präcipitation: 0,1 Ks. III mit je 1 ccm inaktiven Meerschweinchenserumverdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000): negativ.

Mit den gleichen Verdünnungen von Organplasma aus Meerschweinchennierenpulver: negativ.

Mit den gleichen Verdünnungen von Organplasmen aus Kaninchennieren: negativ.

Negativ verliefen auch alle Komplementbindungsversuche mit den gleichen Antigenen (0,1 bis 0,00005) und je 0,1 ccm Ks. III.

Ergebnis: Ks. III präcipitiert weder mit Organplasmen noch mit der Vorbehandlung homologem Blutserum noch bindet es mit einem dieser Antigene Komplement.

Kaninchen IV: In 5 tägigen Intervallen 4 mal vorbehandelt. Antigen: Meerschweinchennierenorganplasma wird mit 0,2%iger Essigsäure gefällt, der Niederschlag sofort wieder in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Serum Kaninchen IV inaktiviert.

Ergebnis: 1. Hammelhämolytin (begonnen mit 0,01): fehlt.

2. Giftigkeit für Meerschweinchen: fehlt.

M. 350 g: 0,5 ccm Ks. IV iv.: 0,

M. 350 g: 1,0 ccm Ks. IV iv.: 0.

3. Komplementbindung mit homologem Nierenplasma, Serum, Menschennierenplasma, ebenso mit dem aufgeschwemmten Essigsäureniederschlag: negativ.

4. Präcipitation vollkommen negativ.

Kaninchen V und VI. Je 5 mal mit je 5 ccm blutfreiem, eiweißreichem Menschenplasma vorbehandelt [subcutane Injektionen von je 5 ccm des Organplasmas]¹⁾.

Ergebnis: Die Sera enthalten kein Hämolysin, zeigen weder mit homologen noch mit heterologen Organplasmen oder Preßsäften Präcipitation oder Komplementfixation.

2 Hühner mit Kaninchenhierenemulsion 4 resp. 8 mal subcutan vorbehandelt.

Ergebnis: Hämolysin für Hammelblut: negativ.

Huhn a): Präcipitation mit Kaninchen Serum (40 fach verdünnt), Kaninchenhierenplasma, Menschennierenplasma negativ, ebenso fallen die Präcipitationsversuche mit diesen Antigenen negativ aus.

Huhn b): Genau gleich.

2 Hühner 4 resp. 5 mal mit Meerschweinchenhierenorganplasma subcutan vorbehandelt.

Hämolyse für Hammelblut (0,1 bis 0,0001 ccm Serum) bei beiden negativ. Der Versuch entsprach der Erwartung, da das Huhn selbst das gleiche hammelhämolytische Antigen besitzt, wie die Meerschweinchenorgane, und es auch bei Meerschweinchen nicht gelingt, durch Vorbehandlung mit eigenen Organen Hammelhämolysine zu erzeugen.

2 Meerschweinchen je 3 mal vorbehandelt mit Schweinemuskelplasma subcutan. 8 Tage nach der dritten Injektion verblutet, Serum inaktiviert.

Komplementbindungsversuch.

Je 0,075 ccm Komplement. Je 0,1 ccm der Meerschweinchenantisera. Je 1 ccm 5%ige sensibilisierte Hammelblutkörperchen. Alles auf 3 ccm mit Kochsalzlösung. Antiserumkontrolle, Kontrolle des hämolytischen Systems und des Komplements.

Antigen	Antiserum I		Antiserum II
Schweinemuskelplasma	0,40	totale Hemmung	spurenweise Hemmung Lösung do.
	0,20	do.	
	0,02	do.	
Hühnermuskelplasma	0,40	Lösung	do. do. do.
	0,20	do.	
	0,02	do.	
Menschennierenorganplasma	0,20	totale Hemmung	totale Hemmung Lösung do.
	0,02	Lösung	
	0,01	do.	

¹⁾ G. Salus und F. Schleißner, Zur Frage des Anaphylaxiegiftes. Med. Klinik 1911, Nr. 25.

Antigen		Antiserum I		Antiserum II	
Antigenkontrollen	Schweine-muskel	0,40	do.	Eiweißgehalt = 3 p. m.	
	Hühner-muskel	0,40	do.	" = 10 p. m.	
	Menschen-nierenplasma	0,20	gerade noch gelöst	" = 2 p. m.	

Anaphylaxieversuche: Als Kriterium der anaphylaktischen Bereitschaft benutzten wir dieselben Symptome, wie in unseren früheren Arbeiten auf dem Gebiete der Anaphylaxie, nämlich das Krankheitsbild des akuten und des protrahierten Choks, und es sei hier nochmals hervorgehoben, daß letzteres nicht bloß nach subcutaner und intraperitonealer Reinjektion, sondern auch bei der von uns ausschließlich geübten intravenösen Probeinjektion in den nicht gleich tödlichen Fällen beobachtet wird, ferner die anämische geblähte Lunge bei überlebendem Herzen. Sonst verwertbare Symptome sind die Herabsetzung der Blutgerinnbarkeit und der Temperaturabfall, die Leukopenie (bei großen Tieren die Senkung des Blutdrucks).

Anaphylaxieversuche.

I. 4 Meerschweinchen. 24. IX. mit je 0,2 ccm klarem, eiweißreichem Kaninchennierenplasma subcutan injiziert. Reinjiziert 13. X.

M. 1 bekommt 1 ccm Kaninchennierenplasma iv. Sofort Krämpfe, Tod. Lungenblähung.

M. 2 bekommt 0,2 ccm Kaninchennierenplasma iv. Deutliche, leichte Anaphylaxie.

M. 3 bekommt 1,6 ccm Menschennierenplasma iv. Typische Anaphylaxie. Erholt.

M. 4 bekommt 1 ccm Menschennierenplasma iv. Keine Erscheinungen.

Die beiden Antigene sind für normale Tiere ungiftig. Das Menschennierenplasma ist an Eiweiß ärmer.

II. 4 Meerschweinchen. 24. IX. subcutan je 0,2 ccm Menschennierenplasma. Iv. reinj. 14. X.

M. 1: 1 ccm Menschennierenplasma. Nach 4 Minuten Atmen mit eingezogenem Thorax, in heftigen Krämpfen herumgeschleudert. Schließlich doch erholt.

M. 2: 0,3 ccm Menschenserum (Eiweißgehalt = 7,5 ccm des obigen Nierenplasmas). Bleibt gesund.

M. 3: 2 ccm Kaninchenhierenplasma. Rascher Atem, Paresen, Prostration. Schließlich erholt.

[M. 4: Dieses vorbehandelte Tier bekam 2 ccm sterilen Eiweißharn iv. Verfiel in Krämpfe, Tod. Lunge etwas gebläht, doch hämorrhagisch. Auf 1 ccm des zur Hälfte verdünnten Eiweißharns ($E = \frac{1}{4}$ von 4) bekommt ein normales Meerschweinchen sofort heftige Krämpfe; erholt sich später. Zur Vermeidung dieses Harngiftes wird in den weiteren Versuchen stets dialysierter Harn verwendet (durch Kollodiumschläuche), der sich als primär ganz ungiftig erweist.]

III. 6 Meerschweinchen. 28. IX. mit je 0,1 ccm Menschennierenemulsion subcutan vorbehandelt. Iv. reinj.

M. 1: 14. X. 1 ccm Menschennierenplasma. Schwer krank, rascher Atem; Prostration, Paresen. Erholt.

M. 2: 16. X. 1,5 ccm Menschennierenplasma. Sofort heftige Krämpfe. Tod. Lungenblähung.

M. 3: 16. X. 1 ccm Menschennierenplasma. Wie bei M. 1.

M. 4: 16. X. 1 ccm Kaninchenhierenplasma. Unruhe, Nasenreiben, Würgen. Erholt.

[Normales Meerschweinchen: 1,3 ccm dialysierter Harn (6‰ Eiweiß). Bleibt gesund.]

M. 5: 1 ccm dialysierter Harn (6‰ Eiweiß). Bleibt gesund.

M. 6: 1,8 ccm dialysierter Harn (6‰ Eiweiß). Bleibt gesund.

IV. 2 Meerschweinchen. 15. X. mit je 0,1 ccm Menschenserum vorbehandelt. Subcutan reinj. 4. XI. iv.

M. 1: 0,1 ccm Menschenserum. Unruhe, Pfotenbeißen, Würgkrampf, Nasenreiben, Paresen. Erholt.

M. 2: 2 ccm Menschennierenplasma. Bleibt gesund.

V. 5 Meerschweinchen. 16. X. subcutan je 0,5 ccm Kaninchenhierenplasma. 7. XI. iv. reinj. (22 d.).

Meerschw.	Flüssigkeit	Menge ccm	Eiweiß- gehalt ‰	Erscheinungen	Injizierte Eiweiß- menge
1	Kaninchenhieren- plasma	3,0	1,2	Nach Inkubation allge- meine Krämpfe, dann liegt das Tier, mit ge- sträubtem Fell, rasch atmend da; schließlich erholt.	0,0036
2	do.	4,0	1,2	do.	0,0048
3	Kaninchenmuskul- plasma	3,0	2,0	Heftige Krämpfe (nach ca. 4 Std. tot).	0,006
4	Menschennieren- plasma	3,0	0,75	Mäßige Anaphylaxie- erscheinungen.	0,00225
5	Inaktiviertes Kaninchen Serum	0,2 <small>in 1 ccm NaCl</small>	40,0	0	0,008

VI. 5 Meerschweinchen. 23. X. subcutan je 0,3 ccm Kaninchen-nierenplasma. Iv. reinj. 15. XI.

Meerschw.	Flüssigkeit	Menge ccm	Eiweiß- gehalt ‰	Erscheinungen	Injizierte Eiweiß- menge
1	Menschennieren- plasma	2,0	1	Schwerer Chok, nach 2Std. noch krank. Erholt.	0,002
2	Kaninchenmuskel- plasma	2,0	3	Sofort Krämpfe. Tod. Intensiv geblähte blasse Lungen bei sich noch kontrah. Herzmuskel.	0,006
3	Kalbsmuskel- plasma	2,0	2	Schwer krank (ohne Krämpfe), [fliegd. Atem, Paresen]. Erholt.	0,004
4	do.	2,0	3	Ähnlich, eher etwas leichter.	0,006
5	Menschlicher Ei- weißharn, dialy- siert	2,5	3	0	0,0075
	Normale Kontrolle für Kalbsmuskel- plasma	2,5	2	0	0,005

VII. 5 Meerschweinchen. 12. IX. subcutan mit je 0,2 ccm dialy-
siertem Nephritisharn (3‰ E.) vorbehandelt. Iv. reinj. 3. XII.

Meerschw.	Flüssigkeit	Menge ccm	Eiweiß- gehalt ‰	Erscheinungen	Injizierte Eiweiß- menge
1	3. XII. Menschen- serum	0,50	—	Nach einigen Minuten allgem. Krämpfe. Tod. Lungenblähung.	ca. 0,02
2	5. XII. do.	0,50	—	do.	ca. 0,02
3	5. XII. do.	0,05	—	Nach 3 Min. Pfotenbeißen. Pharynxkrampf, dann allgem. Krämpfe. Dennoch erholt.	ca. 0,002
4	3. XII. do.	0,02	—	Ganz leichte Erschei- nungen.	ca. 0,0008
5	3. XII. Menschen- nierenplasma	2,50	1	0	ca. 0,0025

VIII. 5 Meerschweinchen. 18. XI. je 0,4 eines 4⁰/₁₀₀ Eiweiß enthaltenden Kalbfleischplasmas subcutan. Iv. reinj.

Meerschw.	Flüssigkeit	Menge ccm	Eiweiß- gehalt ‰	Erscheinungen	Injizierte Eiweiß- menge
1	12. XII. Schweine- muskelplasma	2,0	4	Leichte Anaphylaxie.	0,008
2	12. XII. Hunde- leberplasma (aus Pulver)	2,0	2	Nicht deutlich positiv.	0,004
3	Menschennieren- plasma	2,0	2	Leichte Anaphylaxie.	0,004
4	15. XII. Hunde- leberplasma	3,0	2	Nicht deutlich positiv.	0,006 ¹⁾
5	15. XII. Menschen- nierenplasma	2,5	2	Heftiger Chok. Erholt.	0,005

IX. 9 Meerschweinchen. 14. XI. subcutan je 0,2 ccm Kaninchen-
muskelplasma (3⁰/₁₀₀ Esbach). Iv. reinj. nach 22 bis 25 Tagen.

Meerschw.	Flüssigkeit	Menge ccm	Eiweiß- gehalt ‰	Erscheinungen	Injizierte Eiweiß- menge
1	6. XII. Menschen- nierenplasma	2,5	2	Ganz leichte Anaphyl.	0,005
2	6. XII. do.	3,0	2	do.	0,006
3	6. XII. Schweine- muskelplasma	2,0	4	Sofort Krämpfe. Tod. Lungenblähung.	0,008
	[Normales Kon- trolltier, Schweine- muskelplasma	2,0	4	0	0,008]
4	Schweinemuskel- plasma	1,0	4	Mäßige Erscheinungen.	0,004
5	9. XII. Menschen- nierenplasma	2,5	2	Heftiger Chok mit all- gemeinen Krämpfen; dennoch schließl. erholt.	0,005
	[9. XII. Normale Kontrolle, Men- schennierenplasma	2,5	2	0	0,005]
6	9. XII. Menschen- serum	1,0	40	0	0,04
7	9. XII. Hühner- muskelplasma	1,0	9	0	0,009
8	9. XII. do.	2,0	9	0	0,018
9	9. XII. Hühner- leberplasma (goldgelb)	1,0	3	Heftige Krämpfe. Erholt.	0,003 ²⁾
	[Normale Kontrolle	1,3	3	do.	0,0039 ²⁾

¹⁾ Aus altem Hundeleberpulver. — ²⁾ Primär giftig (Gallensäuren?).

XI. 5 Meerschweinchen. 2. XII. subcutan je 0,2 ccm Schweinemuskelplasma. Iv. reinj. 20. XII.

Meerschw.	Flüssigkeit	Menge ccm	Eiweiß- gehalt ‰	Erscheinungen	Injizierte Eiweiß- menge
1	Schweinemuskel- plasma	2,5	3	Nach 2 Min. allgemeine Krämpfe. Tod. Exzessive Lungenblähung b. weiter- schlagendem Herzen.	0,0075
2	Menschennieren- plasma	3,75	2	Heftige allgem. Krämpfe, dann längere Zeit ruhig mit fliegendem Atem, dann neuerliche Krämpfe. Nach 4 Std. tot.	0,0075
3	Hühnermuskel- plasma	2,0	10	0	0,02
4	Froschmuskel- plasma	2,5	3	Pfotenbeißen, Nasen- reiben, rasch vorüber- gehend.	0,0075
5	do.	3,0	3	do.	0,009
3	22. XII. Schweine- muskelplasma	3,0	10	0	0,03
4	22. XII. do.	2,0	10	Sofort Krämpfe. Tod. Intensiv geblähte blasser Lunge, schlagend. Herz.	0,02
5	22. XII. do.	1,7	10	Sofort Krämpfe. Tod. Lungenblähung usw.	0,017
	22. XII. Normale Kontrolle, Schweinemuskel- plasma	3,0	10	0	0,03

2. Reinjektion.

Überblicken wir die bisherigen Anaphylaxieversuche, so zeigen sie zunächst, daß es durch bloß einmalige Vorbehandlung mit Organeweiß oder Organplasma (Niere, Muskel) gelingt, eine anaphylaktische Sensibilisierung zu erzielen, die bei der Reinjektion nach entsprechendem Intervall (stets intravenös) den Chok in typischer Weise, meist mit Inkubation, auslöst. Die Sensibilisierung scheint gegen Organeweiß im allgemeinen gerichtet, und es hat den Anschein, daß, von kleinen individuellen Schwankungen abgesehen, weder art- noch organgleiches Plasma reinjiziert werden muß. Auffallend ist besonders, daß die meist sehr eiweißreichen Muskelplasma mit fremden Nieren-

plasmen alternieren können bei Sensibilisierung und Reinjektion. Man kann demnach mit Hilfe des Anaphylaxieversuchs die Frage, ob in einer Flüssigkeit freies, nicht besetztes Menschenorganeiweiß vorliegt, derart entscheiden, daß man mit einem heterogenen Plasma, z. B. Kaninchen- oder Schweinemuskelplasma, vorbehandelte Meerschweinchen mit dieser Flüssigkeit reinjiziert, oder umgekehrt. Damit entgeht man auch der Schwierigkeit, die durch nicht absolute Blutfreiheit des Antigens entstehen kann, wie Versuch XII und XIII zeigen.

Weiter geht aus diesen Versuchen auch die Blutfremdheit der Nieren- und Muskelplasmen deutlich hervor, sowie die Zusammengehörigkeit von Blutserum und Harneiweiß.

Endlich sei darauf hingewiesen, daß die Plasmen von Vogel- (Huhn)muskel und Kaltblüter(Frosch)muskel bei der Reinjektion der mit Säugetierorganplasma vorbehandelten (5) Tiere keine resp. minimale Ausschläge gaben und letztere (2) 48 Stunden später auf die (2.) Reinjektion des zur Vorbehandlung verwendeten Antigens mit typischem, tödlichem Chok antworteten.

Weitgehende Schlüsse sollen aus diesen wenigen Versuchen vorläufig betreffs des Verhaltens von Vogel und Kaltblüter nicht gezogen werden.

Ob trotz der universellen Sensibilisierung, der „Spezifität des Organeiweißes“, doch eine Bevorzugung art- oder organgleicher Plasmen in gewissem Grade besteht, läßt sich vorerst nicht gut sagen, doch geht aus den angefügten Esbachwerten hervor, daß weit eher die Menge des injizierten Organeiweißes entscheidend ist; es wäre also in Zukunft stets vorerst die zur tödlichen Reinjektion nötige Menge von Organplasmaeiweiß zu bestimmen; ferner geht daraus hervor, daß man mit dieser Methodik und bei heterologer Sensibilisierung mit Gewißheit nur nach löslichem Organeiweiß, nicht nach dem eines bestimmten Organs fahnden kann.

XII. 4 Meerschweinchen. 5. IX. mit je 0,1 ccm artgleichen Nierenplasmas vorbehandelt. Iv. reinj. 23. IX.

M. 1 mit homologem Nierenplasma,	} bleiben insgesamt gesund.
M. 2 " homologer Nierenemulsion,	
M. 3 " Kaninchennierenplasma,	
M. 4 " "	

XIII. 3 Meerschweinchen. 8. XI. mit je 0,5 ccm artgleichen Nieren-

Biochemische Zeitschrift Band 60. 2

plasmas vorbehandelt. Iv. reinj. nach 3 hbd. mit 2,3, 3,75, 4 ccm homologen Nierenplasmas (3‰ Eiweiß). Bleiben ebenfalls gesund.

Es ist uns also durch einmalige Vorbehandlung nicht gelungen, das Meerschweinchen gegen eigenes Nierenplasma anaphylaktisch zu machen.

Schließlich seien noch die 3 Versuchsreihen angeführt, in denen sich abweichende Resultate ergaben.

XIV. 4 Meerschweinchen. 15. X. mit je 0,5 ccm (6‰ E.) Nephritisharn vorbehandelt. Iv. reinj. 11. XI.

Meerschw.	Flüssigkeit	Menge ccm	Eiweiß- gehalt ‰	Erscheinungen	Injizierte Eiweiß- menge
1	Dialysierter Nephritisharn	0,75	3,0	Schwerster Chok. Nach einigen Stunden tot.	0,00225
2	Menschenserum, inaktiv	0,055	40,0	Schwerster Chok. Erholt.	0,0022
3	Kaninchennieren- plasma	3,0	1,2	0	0,0036
4	Menschennieren- plasma	3,0	1,0	Ganz leichte, rasch schwindende Erschei- nungen.	0,003 ¹⁾

XV. 6 Meerschweinchen. 15. X. subcutan je 1 ccm Menschennierenplasma. Iv. reinj. 11. XI.

Meerschw.	Flüssigkeit	Menge ccm	Eiweiß- gehalt ‰	Erscheinungen	Injizierte Eiweiß- menge
1	Menschennieren- plasma	2,0	1	Nach $\frac{1}{4}$ Std. Krämpfe. Tod. Lungenblähung, Herz maximal dilatiert.	0,002
2	do.	1,0	1	do.	0,001
3	do.	0,5	1	Heftiger Chok. Erholt.	0,0005
4	Kaninchennieren- plasma	1,0	3	Mäßige Anaphylaxie. Erholt.	0,003
5	Menschenserum	0,05	40	0	0,002
6	Menschenharn (Nephritis)	1,0	3	Ganz leichte Erschei- nungen, rasch vorüber- gehend.	0,003
	Normaltier, Menschenharn	1,5	3	0	0,0045

¹⁾ Das Antigen gibt positive Blutprobe.

Es ist klar, daß diese geringen Reaktionen vom Blutgehalte des Menschennierenplasmas herrühren. Im Versuch XIV war das zur Reinjektion verwendete Plasma etwas bluthaltig, im Versuch XV das zur Sensibilisierung verwendete Antigen. Wenn das Harn- und Plasmaeiweiß identisch wären, dann müßten die Ausschläge in beiden Fällen nicht minimale, sondern schwerste oder eher tödliche sein.

Dagegen ist der folgende Versuch ebenso interessant, als vorläufig noch der Klärung harrend¹⁾.

XVI. 3 Meerschweinchen. Einmal mit nativem Eiterharn ergebnislos injiziert; erhalten 4 hbd. später (14. XI.) je 1 ccm dialysierten Eiweißharn (11⁰/₁₀₀). Nach 3 Std. iv. reinj.

Meerschw.	Flüssigkeit	Menge ccm	Eiweiß- gehalt ‰	Erscheinungen	Injizierte Eiweiß- menge
1	Menschennierenplasma	2,5	2	Sofort Krämpfe. Tod. Lungenblähung.	0,005
2	Schweinemuskelplasma	2,0	4	Schwerster Chok, sehr protrahiert; schließlich erholt.	0,008
3	do.	3,0	4	Sofort allgem. Krämpfe. Tod. Lungenblähung.	0,012
	Kontrolltier, Schweinemuskelplasma	3,0	4	0	0,012
	Kleines Kontrolltier, Schweinemuskelplasma	3,0	4	0	0,012

Ergebnisse.

1. Wie das Pohlsche Organplasma chemisch vom Serum-eiweiß vollkommen verschieden ist, so besteht auch biologisch eine totale Verschiedenheit beider. Das Organplasma ist, wenn blutfrei, auch „blutfremd“.

2. Immunkörper gegen Serumeiweiß (präcipitierende, komplementbindende und anaphylaktogene) wirken nicht mit Organplasma (Niere, Muskel) als Antigen, und wir konnten durch Vorbehandlung mit letzterem auch keine Immunstoffe gegen Serumeiweiß erzielen.

¹⁾ Hier liegt zweifellos eine Sensibilisierung gegen Organeiweiß durch Harn vor und es fragt sich, ob der Eitergehalt oder die relativ große Menge sehr eiweißreichen Harnes diese sensibilisierenden Organeiweißpuren enthält. Nach unseren bisherigen Versuchen sind auch Leukocyten blutfremd.

3. Während es große Schwierigkeiten hat, präcipitierende Antikörper gegen Organeweiß zu erhalten, ist es leichter, vom Meerschweinchen komplementbindende Antikörper zu gewinnen, schwer dagegen vom Kaninchen oder entfernteren Arten. Auch darin unterscheiden sich die Blutsera und Organplasmen.

4. Am leichtesten gelingt die anaphylaktische Sensibilisierung von Meerschweinchen mit Plasmen (Niere, Muskel). Diese Antikörper sind weder art- noch organspezifisch, zeigen vielmehr einen eigenen, niederen Grad von Spezifität, „die Spezifität des Organeißes“. Wenigstens konnten wir für Nieren- und Muskelplasmen verschiedener Säugetiere die gegenseitige Substituierbarkeit zeigen. Es besteht also auch hier nahe Verwandtschaft zwischen Muskel- und Organplasmen.

5. Ob daneben den artgleichen Organplasmen doch ein Vorzug zukommt, läßt sich vorläufig nicht sicher sagen, doch dürfte eher die Menge des zur Reinjektion einverleibten Eiweißes (Nucleoproteids) für die Schwere des anaphylaktischen Choks entscheidend sein.

6. Diesen Versuch kann man nicht zum Nachweis eines bestimmten Organeißes verwenden, wohl aber zur Lösung der Frage, ob in einer Flüssigkeit überhaupt natives Organeiß vorliegt. Dabei ist es möglich, zur Vermeidung der Fehlerquellen durch beigemengte Blutspuren artfremdes Organeiß als Antigen zur Sensibilisierung oder Reinjektion zu verwenden (Eiweißbestimmungen für die den Chok auslösende Menge und in der zu prüfenden Flüssigkeit sind angezeigt). Hühner- und Froschplasma erwies sich in einigen Versuchen refraktär gegen Sensibilisierung mit Säugetierplasma.

7. Das hammelhämolytische Antigen der Meerschweinchen-nieren geht leicht ins Organplasma über, und man erzeugt mit letzterem bei Kaninchen hochwertige hammelblutlösende, per venam für Meerschweinchen giftige Antisera.

8. Derartige Sera sind mit Meerschweinchennierenplasmen nicht zu erzielen: a) bei Hühnern, die das gleiche Organantigen besitzen, b) beim Meerschweinchen selbst (wie schon von Dörr festgestellt), das wir auch gegen arteigenes Nierenplasma durch einmalige Vorbehandlung damit nicht deutlich präparieren konnten. Es scheint also auch für diese auffallend wenig

spezifische Sensibilisierung die Artverschiedenheit des Tieres nicht ganz gleichgültig zu sein.

9. Von den Fragen der Physiologie kann bezüglich des Nahrungseiweißes gesagt werden, daß es zunächst zu artspezifischem Eiweiß umgeprägt wird. Falls dieser Artunterschied schon dem Chylus zukommt (wie es wahrscheinlich ist, aber noch Gegenstand weiterer Untersuchung sein soll), dann wäre diese Artanpassung der Nahrung eine Funktion der Verdauungssäfte, und diese wären von fremden Arten nicht glatt substituierbar, wenn sie auch im künstlichen Verdauungsversuch chemisch anscheinend gleiche Produkte lieferten. Zweifellos ist die Artspezifität wichtig (für Entgiftung nicht nur, sondern auch für die Verwertbarkeit als Baumaterial der betreffenden Art), sie ist aber nur ein Durchgangstadium und endet schon beim löslichen Organeiweiß. Das Zelleiweiß hat die Artspezifität seines Nährstromes völlig abgelegt. Das Organeiweiß, soweit es im Plasma vorliegt, ist arm an Antigenen, und selbst diese haben nur einen sehr niedrigen Spezifitätsgrad. Nur im Innern der Zellen scheint eine geringe Menge spezifischen präcipitino-genen Antigens eingeschlossen. Da nach H. Wieners¹⁾ Theorie ein allmählicher, stufenweiser Übergang vom Serum bis zum definitiven, unlöslichen Zelleiweiß erfolgen soll und diese Stufen sich durch die Formoladdition trennen lassen, wäre es verlockend, diese einzelnen Organeiweißfraktionen getrennt auf ihre antigenen Fähigkeiten zu prüfen.

Zeigt doch die biologische Untersuchung vielfache Übereinstimmung mit den chemischen Ermittlungen. Wie in letzter Zeit die physiologische Chemie zunächst erkannte (Hamarsten), daß die Organe nur wenig dem Bluteiweiß entsprechendes Eiweiß enthalten, wie dann durch J. Pohl gezeigt wurde, daß das Organplasma vollkommen vom Serumeiweiß verschieden sei — trotz Übereinstimmung der Gesamtanalyse —, so zeigt nun auch die serologische Untersuchung totale Blutfremdheit des löslichen Organeiweißes und sehr geringen, wenig spezifischen Antigenbestand, entsprechend den offenbar nur geringen chemischen Verschiedenheiten der Organplasmen.

¹⁾ H. Wiener, Studien über Zelleiweiß mit Hilfe der Formoladdition. Diese Zeitschr. 56, Heft 1/2, 1913.

Auch sonst fehlt es nicht an Parallelen. Die Linsensubstanz ist blutfremd und von den übrigen Organen chemisch verschieden, dagegen sind die verschiedenen Linsensubstanzen chemisch gleich — damit stimmt vollkommen die Organspezifität der Linse erwachsener Menschen und Tiere. Die Erythrocyten sind blutfremd und chemisch verschieden vom übrigen Körpereweiß, sie sind daher organspezifisch; aber auch untereinander sind die verschiedenen Hämoglobine besonders im Krystallisationsvermögen und in der Krystallisationsform nicht ganz gleich, sie sind aber artspezifisch und zeigen also chemisch und biologisch den höchsten Grad der Spezifität.

Doch in bezug auf das Blutserum sind wir mit der Sero-
logie vorläufig weiter gekommen; hier überrascht der enorme Antigenreichtum und seine Mannigfaltigkeit, die Artspezifität, die sich durch Wahl geeigneter Antiserumspender bis zur Höhe der qualitativen Spezifität treiben läßt. Die vergleichenden chemischen Serumanalysen haben gleich große Unterschiede der verschiedenen Sera bisher nicht zutage gefördert.

10. Von den pathologischen Problemen haben wir bisher die Frage nach der Herkunft des Eiweißes bei Nephritis in den Bereich unserer Versuche gezogen. Schon frühere Beobachter (Uhlenhuth, Mertens¹), Schütze u. a.) haben gezeigt, daß der nephritische Harn mit präcipitierenden und komplementbindenden Serumantiseris reagiert und als Antigen Antikörper erzeugt, die mit Blutserum der gleichen Art reagieren. Grund prüfte eine Anzahl eiweißhaltiger Harne gegen präcipitierende Sera, die durch Absättigung spezifisch auf Blutserum oder auf Nierenpreßsaft eingestellt waren. Mit ersteren reagierten die Harne, mit letzteren nicht. Alle diese Autoren leiten daher das Harneiweiß vom Blutserum her, was auch der älteren physiologischen Theorie entspricht.

Indessen ist die schon von früheren Autoren (Castaigne und Rathery) ausgesprochene Meinung, daß bei Nephritis größere Teile des schwer geschädigten Nierengewebes (Epithelien) gelöst in den Harn gelangen, neuerdings von M. H. Fischer²) als Stütze seiner physikalischen Nephritistheorie aufgenommen

¹) Mertens, Deutsche med. Wochenschr. 1901, 161.

²) Martin H. Fischer, Die Nephritis. Dresden 1912, Theod. Steinkopf.

worden. Er leitet ebenfalls das Harneiweiß aus dem Nierengewebe her, das durch Säurebildung in den Nieren zur Lösung komme. Da das Gewebseiweiß dieselben Reaktionen gebe wie das Bluteiweiß, könne dieser Umstand für die neue Auffassung kein Hindernis abgeben. Diese Theorie hat offenbar viel Anklang gefunden, und es sei hervorgehoben, daß wir die Bedeutung der Säurebildung in den Geweben für das Zustandekommen der Nephritis, der Ödeme, der anatomischen Veränderungen nicht anfechten, da wir darüber keine Untersuchungen angestellt haben. Bloß die Ableitung des Eiweißes bei parenchymatöser Nephritis aus dem Nierengewebe muß uns — als Regel aufgestellt — nach unseren serologischen Untersuchungen unhaltbar erscheinen, denn: 1. Von 10 Harnen mit Eiweiß, Cylindern und renalen Elementen reagierte nur einer mit blutserumpräcipitierendem Kaninchenserum viel zu schwach gegenüber seinem Eiweißgehalt, während alle anderen damit auch in entsprechenden Verdünnungen Präcipitate lieferten. (Als der Eiweißgehalt von 5 auf 11 p. m. gestiegen war, gab auch er mit Antimenschenserum noch in 200facher Verdünnung Präcipitate, allerdings ein niederer Titer; es ist derselbe Harn, von dem wir [XVI] zugeben, daß er etwas Gewebseiweiß enthalten haben konnte. Bald letal abgelaufen.) 2. Durch Injektion von Eiweißharnen bekamen wir präcipitierendes Kaninchenmenschenserum. 3. Antimenschenserum, das mit nephritischen Harnen Präcipitate gab, präcipitierte nicht mit löslichem Nierenorganeiweiß. 4. Kaninchen, die mit blutfreiem Menschennierenplasma vorbehandelt waren, auch oft, gaben weder präcipitierende noch komplementbindende Antikörper für Blutserum oder Nephritisharn. 5. Mit Nephritisharn oder Blutserum war eine anaphylaktische Sensibilisierung für blutfreies Organeiweiß nicht gegeben, und Organeiweiß bewirkte nur dann minimale Überempfindlichkeit gegen Serum- und Harneiweiß, wenn es deutliche Blutreaktion gab. Es ist also durch diese weiter ausgedehnten Ermittlungen die Herkunft des nephritischen Harneiweißes aus dem Nierengewebe als Regel wohl genügend widerlegt, wenn auch die Möglichkeit nicht geleugnet werden soll, daß mitunter die gelöste „Harnmembran“ einen kleinen Beitrag zum Harneiweiß beisteuern kann. Diese Untersuchungen sollen noch auf eine größere Reihe von Nephritisparenchymatosa-

harnen ausgedehnt werden. Man könnte vielleicht den Einwand erheben, daß wir hauptsächlich mit dem Organplasma gearbeitet haben; aber man darf wohl annehmen, daß dieses wasser- und kochsalzlösliche Eiweiß des Nierenparenchyms zu allererst im Harn auftreten müßte.

Eine Zustimmung zur Auffassung von M. H. Fischer würde die — kaum diskutabel — Voraussetzung erfordern, daß das Organeiweiß, bereits völlig blutfremd geworden, wenn es durch Säuren in Lösung geht, die antigenen Eigenschaften des Bluteserums wiedergewinne.

Übrigens dürften es nach der Lehre von J. Pohl auch die Chemiker bei der Prüfung dieser Frage nicht mehr bei der Anwendung der Gruppenreaktionen auf das Harneiweiß bewenden lassen.

Von großem Interesse wären experimentelle Untersuchungen über das Auftreten der spezifischen Abderhaldenschen Schutzfermente nach Einverleibung dieser in der Regel ungiftigen Organplasmen.

Über die Anpassung von Mikroorganismen an Gifte.

Von

Hans Euler und Harald Cramér.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Eingegangen am 13. Januar 1914.)

Mit 1 Figur im Text.

Effront¹⁾ hat bekanntlich die große Anpassungsfähigkeit der Hefe an Fluorsalze und Flußsäure entdeckt und zur Grundlage eines sehr bemerkenswerten technischen Gärungsverfahrens gemacht. Durch seine Versuche wissen wir, daß die Hefe an außerordentlich großen Mengen von Fluoriden — bis 3000 mg per Liter — angepaßt werden kann. Sie kann dadurch in Gegenwart solcher Mengen Fluorammonium oder Fluornatrium, welche die unvorbehandelte Hefe vollständig töten würden, eine bedeutende Gärtätigkeit entwickeln, welche die unter normalen Umständen auftretende sogar noch übertrifft. Offenbar ist diese Entdeckung von weittragender, nicht allein technischer, sondern auch wissenschaftlicher Bedeutung, um so mehr, als das genannte Phänomen nicht nur bei Hefen eintritt, sondern auch bei anderen Mikroorganismen sowie bei höheren pflanzlichen und tierischen Organismen beobachtet werden kann.

Vom biochemischen Standpunkt aus ist nun die wichtigste Frage, welcher Art die Vorgänge sind, die das Protoplasma so verändern, daß Giftmengen, die ursprünglich den Tod der Zellen herbeiführen, nach einer gewissen Anpassungszeit vertragen werden können und sogar die Intensität vitaler Vorgänge erhöhen.

Bisherige Erfahrungen über die Wirkung besonders organischer Gifte legen die Annahme nahe, daß auch die An-

¹⁾ Mon. scient. Quesneville 73, 254, 1891; 38, 1138, 1891; [4] 19, 19, 1905. — Bull. Soc. Chim. [3] 5, 731, 1891.

passung an Stoffe wie Fluornatrium in der Bildung von Antikörpern besteht, die das Plasma vor der vernichtenden Einwirkung des genannten Salzes schützen. Speziell wird man zu untersuchen haben, ob es sich bei der schädigenden Einwirkung der Fluoride nicht um die Fällung von Eiweißstoffen handelt, die bei der Anpassung an die Fluorsalze in irgendeiner Weise durch Bindung der Fluoride gehindert wird.

Effront hat nachgewiesen, daß die den Fluorsalzen angepaßte Hefe einen hohen Aschengehalt, und besonders einen hohen Kalkgehalt besitzt, und daß bei weiterer Züchtung der Hefe in fluorfreien Medien Fluortoleranz und Kalkgehalt gleichzeitig wieder abnehmen.

Diese an sich sehr interessante Beobachtung läßt aber den eigentlichen Vorgang der Anpassung unaufgeklärt, da ja der vermehrte Kalkgehalt vermutlich nur eine Begleiterscheinung des durch die Anpassung vermehrten Fluorgehaltes ist. Jedenfalls ist nicht ohne weiteres ersichtlich, ob gerade der höhere Kalkgehalt die Lebensfähigkeit der Hefe in den fluorhaltigen Medien bedingt.

Unsere Untersuchungen gelten der Frage, ob sich in der Hefe, die sich längere Zeit in der fluornatriumhaltigen Lösung befindet, ein Schutzstoff gegen die Wirkung der Fluorionen bildet. Besonders aber scheint uns ein Punkt der eingehenden Prüfung wert, dem bei derartigen Arbeiten auf tierphysiologischem Gebiet noch wenig Aufmerksamkeit gewidmet wurde, nämlich dem zeitlichen Verlauf der Bildung von Antikörpern — oder hypothesenfreier von Anpassungsstoffen — und besonders dem Beginn dieses Prozesses. In welchem Grade bildet der Organismus Anpassungsstoffe während der Vergiftungsperiode, d. h. in der Zeit, in der die später gesteigerten vitalen Tätigkeiten noch herabgesetzt sind? Gerade mit dieser Phase des Anpassungsprozesses wollen wir uns in einigen Untersuchungen beschäftigen, zu denen die folgenden Versuche die Vorarbeit bilden.

Versuche.

Wir haben zwei Versuchsreihen angestellt, die ein nahezu übereinstimmendes Resultat ergeben haben. Wir beschränken uns darauf, den einen dieser Versuche zu beschreiben.

Eine große Anzahl Literkolben, je 500 ccm sterilisierte Lindnersche Nährlösung mit 2% Glucose und 0,05 g NaF, enthaltend, wurden mit je 6 g frischer Preßhefe geimpft.

Eine gleiche Anzahl ganz analoger Kontrollversuche wurde ohne Zusatz von Fluornatrium angestellt. Jeden Tag wurde ein Kolben mit Fluornatrium und ein NaF-freier Kolben untersucht, die Hefe wurde auf Ton getrocknet und ihre Gärungs- und Inversionsfähigkeit gemessen. Auch wurden jeden Tag die Zellen im Mikroskop untersucht.

Bei den Gärungsversuchen wurden 0,5 g Hefe in 20 ccm 10% iger Rohrzuckerlösung eingewogen, bei den Inversionsversuchen 0,25 g Hefe in einer Mischung von 20 ccm 20% iger Rohrzuckerlösung und 10 ccm 1% iger Lösung von NaH_2PO_4 . Die Inversionsversuche wurden mit 10 ccm 5% iger Sodalösung abgebrochen. Die Trockensubstanz der Hefe wurde stets durch Trocknen bei 90° festgestellt.

Die Gärungsversuche wurden alle bei 30,8° angestellt, die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus zwei Versuchen; die Inversionsversuche wurden bei Zimmertemperatur (18°) ausgeführt.

1. Unvorbehandelte Hefe. Trockensubstanz 31,30%.

Gärungsversuche		Inversionsversuch		
Min.	ccm CO_2	Min.	α	$k \cdot 10^4$
40	22,5	0	6,77	—
80	45,0	15	5,78	34
120	68,5	25	5,04	37
160	92,0	35	4,48	37
200	114,5	40	4,25	38
		∞	-2,17	—

2. Hefe, 23 Stunden vorbehandelt. Trockensubstanz: mit NaF 30,32%, ohne NaF 26,78%.

Gärungsversuche			Inversionsversuche				
Min.	ccm CO_2		Min.	Mit NaF		Ohne NaF	
	Mit NaF	Ohne NaF		α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$
40	11,5	26	0	6,71	—	6,71	—
80	22,0	54	15	5,50	43	5,14	56
120	35,0	80	25	4,63	46	4,37	53
160	49,0	104	35	4,09	44	3,34	59
200	62,0	123	40	3,63	46	3,05	58
			∞	-2,15	—	-2,15	—

3. Hefe, 47 Stunden vorbehandelt. Trockensubstanz: mit NaF 30,39%, ohne NaF 26,86%.

Gärungsversuche			Inversionsversuche				
ccm CO ₂			Mit NaF		Ohne NaF		
Min.	Mit NaF	Ohne NaF	Min.	α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$
40	9,5	24,0	0	6,70	—	6,70	—
80	21,5	49,0	15	5,25	52	5,24	52
120	37,0	72,0	25	4,43	52	4,31	55
160	51,5	95,5	35	3,90	47	3,71	51
200	67,0	115,0	40	3,64	46	3,15	55
			∞	-2,14	—	-2,14	—

4. Hefe, 118 Stunden vorbehandelt. Trockensubstanz: mit NaF 50,19%, ohne NaF 29,38%.

Gärungsversuche			Inversionsversuche				
ccm CO ₂			Mit NaF		Ohne NaF		
Min.	Mit NaF	Ohne NaF	Min.	α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$
40	2,0	13,5	0	6,57	—	6,57	—
120	7,0	44,0	15	4,01	95	4,82	65
160	9,5	60,5	25	2,84	94	3,76	64
200	13,5	77,5	35	—	—	2,99	71
			40	—	—	2,55	68
			∞	-2,10	—	-2,10	—

Die während 5 Tagen mit Fluornatrium vorbehandelte Hefe zeigte unter dem Mikroskop ein stark verändertes Aussehen. Das Plasma war stark kontrahiert und in Klumpen zusammengeballt. Die Hefe hatte eine teigartige Konsistenz und erreichte auf Ton einen ungewöhnlich hohen Trockengehalt von etwa 50%.

Der Inhalt der 8 Kolben mit NaF-behandelter Hefe, die nach 5 Tagen noch übrig waren, wurde nun abfiltriert, die Hefe auf Ton getrocknet und gewogen (Hg).

Diese Hefe wurde nun mit der 5fachen Menge Wasser während 16 Stunden bei 30° extrahiert und dann vom Extrakt abfiltriert.

Es wurden nun folgende Lösungen bereitet:

A. 500 ccm Lindners Nährlösung mit 2% Glucose und 0,05 g NaF.

B. Wie A, + 15 ccm des oben beschriebenen Hefenextraktes.

C. 500 ccm Lindners Nährlösung mit 2% Glucose.

Mit jeder der oben beschriebenen Lösungen wurden die drei Kolben gefüllt und mit je 6 g abgepreßter Hefe geimpft. Nach gewissen Zeiträumen wurde je ein Kolben A, B und C

untersucht; die Hefe wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und auf Ton getrocknet. Mit dieser Hefe wurden in der oben beschriebenen Weise Gärungs- und Inversionsversuche angestellt.

1. Unvorbehandelte Hefe. Trockensubstanz 33,59%.

Gärungsversuche		Inversionsversuche		
Min.	ccm CO ₂	Min.	α	k · 10 ⁴
40	24,5	0	6,24	—
80	52,0	15	5,13	42
120	80,0	25	4,38	44
160	106,5	35	3,72	45
200	132,0	40	3,38	46
—	—	∞	— 2,00	—

2. Hefe 23 Stunden vorbehandelt. Trockensubstanz $\left\{ \begin{array}{l} \text{A. } 29,25\% \\ \text{B. } 28,11\% \\ \text{C. } 27,92\% \end{array} \right.$

Gärungsversuche.				
Min.	ccm CO ₂			
	A.	B.	C.	
50	23,5	28,2	40,5	
100	49,7	55,0	79,0	
160	81,2	87,2	119,7	
200	100,5	106,7	143,7	

Inversionsversuche.						
Min.	α	A.		B.		C.
		k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴
0	6,18	—	6,18	—	6,18	—
15	4,84	52	4,87	51	4,57	64
25	4,05	53	4,03	53	3,57	67
35	3,53	49	3,35	53	2,70	69
40	3,43	45	2,96	54	2,38	68
∞	— 1,98	—	— 1,98	—	— 1,98	—

3. Hefe 46 Stunden vorbehandelt. Trockensubstanz $\left\{ \begin{array}{l} \text{A. } 29,61\% \\ \text{B. } 28,24\% \\ \text{C. } 28,38\% \end{array} \right.$

Gärungsversuche. Temperatur 31°.				
Min.	ccm CO ₂			
	A.	B.	C.	
60	17,2	18,2	40,7	
100	29,5	32,0	63,0	
200	66,2	66,7	123,2	

Inversionsversuche.						
Min.	α	A.		B.		C.
		k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴	α	k · 10 ⁴
0	6,18	—	6,18	—	6,18	—
15	4,67	59	—	—	4,33	74
25	3,92	56	3,82	59	3,26	77
40	3,41	45	3,00	54	2,02	77
∞	— 1,98	—	— 1,98	—	— 1,98	—

4. Hefe 70 Stunden vorbehandelt. Trockensubstanz $\left\{ \begin{array}{l} \text{A. 31,45\%} \\ \text{B. 28,56\%} \\ \text{C. 28,26\%} \end{array} \right.$

Gärungsversuche. Temperatur 31°.

Min.	ccm CO ₂		
	A.	B.	C.
40	6,7	7,7	23,2
100	15,7	17,5	55,8
160	26,7	28,8	97,7
200	34,7	37,3	106,2

Inversionsversuche.

Min.	A.		B.		C.	
	α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$	α	$k \cdot 10^4$
0	6,18	—	6,18	—	6,18	—
15	4,52	66	4,38	72	4,23	79
25	3,35	74	3,24	78	3,13	81
35	2,47	75	2,37	78	2,15	84
40	2,11	75	1,94	80	1,76	85
∞	-1,98	—	-1,98	—	-1,98	—

Die Hefezellen der Versuchsreihe B zeigten unter dem Mikroskop ein bedeutend frischeres Aussehen als die Hefe der Versuchsreihe A. Viele Zellen in B waren vollkommen normal.

Rechnet man die oben angegebenen Werte für die Inversionskonstanten und die in 200 Minuten erhaltenen Kubikzentimeter CO₂ auf einen Trockengehalt der Hefe von 30⁰/₀ um, so ergeben sich folgende Zahlen:

Kohlensäure nach 200 Min. in ccm.

Vorbehandlungszeit	0	23	46	70 Stunden
A.	118	103	67	33
B.	118	114	71	39
C.	118	155	130	113

Inversionskonstanten $k \cdot 10^4$.

Vorbehandlungszeit	0	23	46	70 Stunden
A.	39	51	54	69
B.	39	57	60	81
C.	39	72	80	87

Wie aus diesen Zahlen und der Fig. 1 hervorgeht, hat der Zusatz des Extraktes der mit Fluornatrium vorbehandelten Hefe einen deutlichen Effekt. Zur richtigen Beurteilung der Größe dieses Einflusses sei darauf hingewiesen,

in wie großer Verdünnung der Extrakt der vorbehandelten Hefe zur Wirkung kam, nämlich 15 ccm in 500 ccm Lösung.

Wie ein früher angestellter Versuch beweist, übt der Extrakt einer nicht mit NaF vorbehandelten Hefe eine derartige Wirkung nicht aus.

Die hier angegebenen Versuche sind, wie bereits erwähnt, nur als Vorversuche zu betrachten. Wir sind mit Versuchen beschäftigt, die Bildung der Anpassungsstoffe in den bei der Anpassung abgestorbenen und der am Leben gebliebenen Zellen gesondert zu bestimmen.

Herrn phil. Lizentiat B. Palm danken wir für die Mitwirkung bei dieser Arbeit durch die Kontrolle der Hefe bei der Vorbehandlung.

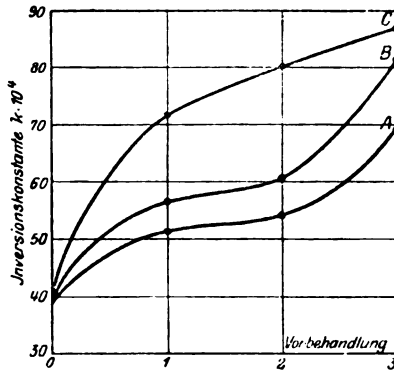


Fig. 1.

Einfluß chronischer Fluorzufuhr auf den Chlor- und Calciumstoffwechsel.

Von

F. Schwyzer.

(Eingegangen am 14. Januar 1914.)

Fluorverbindungen sind anerkannte Protoplasmagifte, aber bei langdauernder Zufuhr kleiner Mengen ist die Grenze des Unschädlichen vielleicht noch nicht so festgestellt, wie es wünschenswert wäre.

Die Gefährlichkeit des Fluors für die lebende Zelle erklärt sich wohl aus der Fällbarkeit des für die Lebensprozesse so wichtigen Calciums durch das Fluor. Bei höherer Fluorkonzentration, wie sie nur im Experiment vorkommen kann, können Fluoralbuminate und Fluorproteincalciumverbindungen entstehen, wodurch plötzliche Muskelstarre (beim Durchleiten einer 1%igen NaF-Lösung) zustande kommt, oder momentanes Koagulieren des Blutes, ein Vorgang, der mit Fibringerinnung nichts gemeinsam hat. Fluor ist ein normaler Bestandteil des tierischen Körpers. Nach Em. Zdarek¹⁾ enthält 1 kg normales Menschenblut 0,0035 Fluor, 1 kg Femur bloß 0,0029 bis 0,0035, 1 kg Humerus 0,0045. Nach Jodlbauer²⁾ enthalten die Zähne am meisten Fluor, nach diesen die Röhrenknochen. Die Provenienz des Fluors ist noch nicht genügend festgestellt. Zweifellos enthalten viele Pflanzen Spuren davon. F. Leperre³⁾ fand Fluor in Trauben und auch im unverfälschten Weine. Der Nachweis kleiner Mengen Fluor ist schwierig, da viele Fluorverbindungen flüchtig sind, und alle in Glas- und Porzellangefäßen verloren gehen können, so daß nur in Platingefäßen gearbeitet werden sollte.

Fluornatrium ist als Konservierungsmittel, besonders für Maische, empfohlen worden, da es für Hefe sehr giftig ist. Brandl und Tappeiner erklärten eine Maische mit NaF 6:100 000 als unschädliches Viehfutter. Der größere Teil des aufgenommenen NaF geht mit Urin und Kot ab, bloß ein Fünftel wurde im Skelett abgelagert. Es mag

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 127, 1910.

²⁾ Zeitschr. f. Biol. N. F. 26, 259, 1902.

³⁾ Bull. Soc. Chim. de Belgique 23.

sein, daß Milch und Fleisch von solchen Tieren ziemlich unschädlich für den Menschen sind — die Tiere sind ja gewissermaßen *intra vitam* einbalsamiert. Aber die Tiere sind krank, selbst wenn sie nicht an der Krankheit sterben —, es kommt nur darauf an, wie lange und wieviel derartige Maische verfüttert wird! Auch Kionka¹⁾ bezweifelt die Unschädlichkeit (für den Menschen) solcher Verfütterung.

Es ist leicht möglich, daß verdorbene, nicht konservierte Maische noch schlimmere Folgen hat als der Fluorzusatz. Ich würde empfehlen, kurz vor dem Gebrauche von Fluormaische eine dem Fluorzusatz entsprechende Menge von Chlorcalcium zuzufügen, damit das entstehende CaF_2 ungelöst mit dem Kot abgehe.

Als „Heil“mittel für den Menschen sind Fluorpräparate zum Glück verlassen. Selbst die Inhalation von 0,01 $\%$ igen HF ist von Enrico Ronzani als schädlich erkannt worden²⁾. Die akute Fluorvergiftung, die unter Benommenheit, Muskelzucken und Krämpfen zum Tode führt, ist von Tappeiner und Schulz genauer studiert worden. Je nach der Art der Zufuhr gibt es dabei auch Lokalwirkungen, Geschwüre in den Respirationswegen beim Einatmen, Reizerscheinungen in den Verdauungsorganen bei Einführung auf diesem Wege. Als akute toxische Dosis bezeichnet Tappeiner 0,15 NaF pro Kilogramm Körpergewicht.

Chronische Fluorvergiftung beim Menschen ist zuerst vom Autor beschrieben worden³⁾. Das Bild war: Multiple Thrombosen infolge enorm erhöhter Gerinnbarkeit des Blutes, Knochenschmerzen, Icterus (Verstopfung der Gallenwege durch sehr erhöhte Kalkausscheidung durch die Leber). Später konnte ich bei Hühnern und Kaninchen einen ähnlichen Zustand hervorrufen durch chronische Fluorzufuhr, allerdings ohne Icterus.

Ich habe nun zu genauerem chemischem Studium diese Experimente an Kaninchen wiederholt. Ich wählte dazu fünf junge Kaninchen (von ca. 3 Monaten), alle aus einem Wurf 3 für Fluorbehandlung, 2 als Kontrolltiere. Ich gab den 3 Fluortieren alle 3 Tage 6 mg NaF als intramuskuläre Injektion, später stieg ich an zu 3 mg pro die. So erhielt

Nr. 1 in 60 Tagen 150 mg und wurde am 137. Lebens-
tage getötet,

Nr. 2 in 85 Tagen 200 mg und wurde am 162. Lebens-
tage getötet,

Nr. 4 in 91 Tagen 300 mg und wurde am 168. Lebens-
tage getötet.

Die normalen Tiere verarbeitete ich: Nr. 2 am 148. Tage

„ 5 „ 169. „

¹⁾ Realenzykl. d. Med. 5, 150, 1908.

²⁾ Arch. f. Hyg. 70, 217, 1909.

³⁾ New York Med. Jour. 1901, 6. Juli.

Das Durchschnittsgewicht eines Fluortieres war 2230 g, der Kontrollen 2425 g, die Zahl der Lebenstage im Durchschnitt 78,6, gegenüber 81 der Kontrollen. Die Koagulationszeiten des Blutes waren

Nr. 1	Nr. 3	Nr. 4
$\frac{3}{4}$ bis $1\frac{1}{2}$ Min.	$\frac{3}{4}$ bis $1\frac{1}{2}$ Min.	2 bis $2\frac{3}{4}$ Min.

Bei den normalen:

Nr. 2	Nr. 5.
$2\frac{1}{2}$ bis 5 Min.	2 bis 5 Min.

Über den hämatologischen Befund habe ich schon früher berichtet (l. c. 1901 und 1902). Blut und Knochen der Tiere wurden z. T. für die chemische Verarbeitung aufgehoben, das übrige Material für pathologisch-anatomische Untersuchungen.

Bekanntlich hat der Kalkgehalt des Blutes einen Einfluß auf die Fibringerinnung. Wird der Kalk gefällt, z. B. durch Oxalate, so wird das Gerinnungsvermögen aufgehoben — Zufuhr von CaCl_2 oder eines anderen löslichen Kalksalzes stellt die Koagulabilität wieder her. Bei chronischer Fluorzufuhr sollte man also eine verminderte Gerinnbarkeit erwarten, weil Fluor Kalk ausfällt. Das letztere kann kaum in Betracht kommen bei den kleinen Dosen von Fluor — der Kalk muß immer noch reichlich im Blute vorhanden sein. Fluornatrium wird auch kaum als solches im Blute kreisen, — viel eher als organische Fluorverbindung, als Fluoreiweißcalciumkombination. Als solche wird Fluor an die Knochenzellen gelangen oder an die auscheidenden Nieren-, Leber- und Darmepithelien. — Ich stellte den Chlorgehalt des Blutes der 5 Tiere fest und fand, je am Todestag des betreffenden Tieres:

Nr. 1	Nr. 3	Nr. 4
3,304 ⁰ / ₁₀₀	2,6122 ⁰ / ₁₀₀	2,6059 ⁰ / ₁₀₀

gegen normal:

Nr. 2	Nr. 5
2,4318 ⁰ / ₁₀₀	2,280 ⁰ / ₁₀₀

Das Blut wurde aus den Arteriae femorales in gewogenen Gefäßen aufgefangen und wohl verschlossen gewogen, dann getrocknet und vorsichtig verkohlt. Die Kohle wurde mit destilliertem Wasser ausgezogen und das Filtrat in üblicher Weise

auf Chlorsilber verarbeitet, und dieses gewogen. Aus dem Filtrat vom Chlorsilber wurde das Silber entfernt und darauf im Filtrat das Calcium (I) bestimmt. Ich arbeitete dabei nach der Methode von H. Aron¹⁾, indem ich das möglichst eingeeengte Filtrat mit reiner konzentrierter Schwefelsäure versetzte und durch Alkoholzusatz das Calciumsulfat als Anhydrid ausfällte und wog. Die Blutkohle wurde nach der Extraktion verascht (mit Säuregemisch nach A. Neumann) und wieder auf wasserfreies Calciumsulfat (II) verarbeitet, das ebenfalls gegläht und gewogen wurde. So erhielt ich folgende Werte als Anhydrid:

	Nr. 1	Nr. 4	Nr. 2(normal)	Nr. 5 (normal)
I.	0,01592 ^{0/100}	0,0080 ^{0/100}	0,01040 ^{0/100}	0,0120 ^{0/100}
II.	0,17943 ^{0/100}	0,0880 ^{0/100}	0,11199 ^{0/100}	0,1208 ^{0/100}

oder beide Portionen addiert und als CaO berechnet:

Nr. 1	Nr. 4	Nr. 2 (normal)	Nr. 5 (normal)	
0,08035 ^{0/100}	0,0396 ^{0/100}	0,0504 ^{0/100}	0,0546 ^{0/100}	CaO

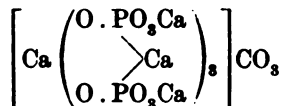
Nr. 2 in zweiter Analyse 0,0521 als Ca-Oxalat auf CaO verarbeitet.

Das Anhydrid wurde in einem Mikrogoochtiiegel aus Platinfolie mit Asbest aufgefangen und mittelst der Mikrowage (W. Nernst) gewogen. In dem Aschenextrakt von Nr. 4 und Nr. 5 suchte ich nochmals nach Chlor, um einen etwa fester gebundenen Chloranteil nicht zu übersehen, und ich fand in der Tat bei Nr. 4 in der Asche von 24,7615 frischen Blutes nach der Extraktion der Kohle noch 1,7 mg AgCl; in Nr. 5 (normal), ursprünglich 16,8370 Blut, im Aschenextrakt noch fast 2 mg AgCl. Diese beiden Chlormengen figurieren in den obigen Prozentsätzen des Chlors nicht, da diese Bestimmung in Nr. 1 und 3 nicht gemacht worden war. Nr. 3 ist mir bei der Verarbeitung der Asche auf Calcium verunglückt.

Wir finden, daß das Fluortier Nr. 1 einen beträchtlichen Chlor- und Kalküberschuß aufweist, Nr. 4 dagegen zeigt fast normalen Chlorgehalt und etwas subnormalen Kalkprozentsatz. Das Tier hatte in der letzten Lebenswoche täglich über 3 mg NaF erhalten, so daß im Momente der Kalk wohl als schwerlösliche Fluorverbindung im Skelett zurückgehalten wurde (wie wir unten sehen werden).

¹⁾ Diese Zeitschr. 4, 268, 1907.

Woher kommt die Vermehrung des Blutkalkes, woher die vermehrte Chlorausscheidung? Ich habe schon früher bei meinem Fluormenschen unter anderm eine starke Kalkausscheidung in den Faeces nachgewiesen. 0,78175% der Asche war CaO, bei möglichst kalkarmer Kost. Die Blutkalkzahlen waren ziemlich normal, doch durften sie damals nur als ganz approximativ gelten. Ich konnte dem ohnehin sehr anämischen Kranken nicht mehr als etwa zweimal je 10 ccm Blut entnehmen und damit ließ sich nur schwierig die Chlor-, Eisen-, Fluor- und Calciumbestimmung vornehmen. Mir schien damals, die Chlorausscheidung müsse in erster Linie auf Kosten der Knochen vor sich gehen, d. h. von dort kommen, wo die klinische Beobachtung den Krankheitsherd lokalisierte. Ein Eindringen des Fluors in ein apatitartiges Knochenmolekül, bestehend aus Calcium, Phosphorsäure, Chlor und vielleicht auch Kohlensäure, war mir wahrscheinlich. Ich bin davon zurückgekommen und nehme eher an, daß der Vorratskalk der Knochen, wohl eine Proteinchlorcalciumverbindung¹⁾, die in der Knochensubstanz zurückgehalten wird, vom Fluor angegriffen wird. Der eigentliche Knochenkalk ist jedenfalls ein sehr festgefügtes und kompliziertes Molekül. Doch möchte ich nicht, wie Th. Gassmann²⁾, eine Formel akzeptieren. Nach A. Werners Theorie der komplexen Verbindungen hält Gassmann die Formel:



für die „Kochenformel“. Wir sind m. E. noch nicht so weit; denn im Knochen existieren als integrierende Bestandteile auch Mg, Cl, F, Na, K, und zwar diese letzteren festgebunden, nicht bloß als Bestandteile der Blut- und Gewebeflüssigkeit. Schon aus Analogie mit der Mineralogie können wir obige Formel nicht als die einzig mögliche auffassen, gerade wie es auch nicht bloß eine apatitartige Verbindung gibt, sondern deren

¹⁾ d. h. von den Kolloiden der Eiweißgruppe wird ein löslicher Kalkkörper im Knochen adsorbiert (H. Aron, Handb. d. Biochem. 2, 181, 1909).

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 161 bis 170, 1910/11.

viele. Chlor z. B. kommt im Knochen als NaCl aus dem Blute vor, daneben aber, wie erwähnt, auch als Chlorcalcium-Vorratskalk, in den Knochenkolloiden adsorbiert. Endlich gibt es aber einen ganz fest gebundenen Chloranteil, der erst bei der Veraschung gewonnen wird, und der wohl ähnlich wie Fluor in schwer löslicher Verbindung gestanden hat (Fluor z. B. als $3 [(PO_4)_2Ca_3] \cdot CaF_2$).

Wie es eine große Zahl von Eiweißkörpern gibt — Abderhalden spricht von fast unumschränkten Möglichkeiten —, so kann aus den Faktoren Ca, Mg, Na, K, P_2O_5 , CO_2 , Cl, F, H_2O irgendeine Zahl von Kombinationen entstehen. Die relativen Zahlen von Ca und Mg sind labil, wie mir scheint, sogar in den verschiedenen Knochen desselben Tieres (Röhren- und flachen Knochen); bei Osteomalacie, Rachitis und Zahncaries besteht eine relative Vermehrung der Magnesia.

Ich analysierte die Tibiae meiner Versuchstiere, die relativ weniger Knochenmark enthalten als die Femora. Dabei wurden einfach die Weichteile, Knorpel und Periost rasch weggekratzt und die Knochen frisch gewogen. Ich vermied absichtlich Auswässern oder Waschen, sondern bestimmte das Chlor in drei Portionen:

- I. im Dekokt des zertrümmerten Knochens,
- II. im wässrigen Extrakt (angesäuert) der Knochenkohle,
- III. in der Lösung der Knochenasche.

Um die Chlorwerte genauer zu bekommen, nahm ich zu Anfang Tibia 1 und 3 zusammen.

	Frischgewicht		Prozent des Frischgewichtes
Tibiae 1 u. 3	7,333	Filtrat I	0,0402 AgCl = 0,0627% Cl
(dextra)	8,517	" II	0,0195 AgCl = 0,0306% Cl
	15,850	" III	0,0009 AgCl = 0,0014% Cl
		Total	0,0947% Cl
 Tibia 2	 9,094	" I	 0,0304 AgCl = 0,0825% Cl
(normal)		" II	0,0140 AgCl = 0,0380% Cl
		" III	0,0004 AgCl = 0,0011% Cl
		Total	0,1205% Cl

Die Tibiae 4 und 5 (normal) wurden in toto verkohlt, in verdünnter HNO_3 gelöst und im Filtrate der Gesamtchlorgehalt bestimmt:

	Frischgewicht		
Tibia 4 (dextra)	8,116	ergibt	0,031 AgCl = 0,0940% Cl
Tibia 5 (normal, dextra)	8,025	"	0,041 AgCl = 0,1260% Cl

Wir finden in den drei Fluortibiae eine Verminderung des Chlorgehaltes gegenüber dem normalen um 25% — nur das Chlor der Asche scheint nicht betroffen zu sein. Doch ist die Bestimmung in der Asche nicht ganz einwandfrei wegen der Flüchtigkeit der Chlorverbindungen. Selbst bei feuchter Veraschung ist bei solch kleinen Mengen ein Verlust möglich. Im wässrigen Extrakt der Knochenkohlen bestimmte ich auch den Calciumgehalt, um den leichtgebundenen Kalk zu finden. Dazu wurde das Silber entfernt, der Kalk als Oxalat gesammelt und als CaCO_3 gewogen.

Tibiae 1 u. 3 $0,0035 \text{ CaCO}_3 = \underline{\text{Ca}} 0,00140 = 0,00883\%$ des Frischgewichtes.

Tibia 2 $0,0034 \text{ CaCO}_3 = \underline{\text{Ca}} 0,00136 = 0,01495\%$ des Frischgewichtes.

Der lose gebundene Calciumgehalt im Fluorknochen betrug nur 59% des Normalgehaltes!

Die Verhältniszahl Mg:Ca ergab eine Vermehrung der Magnesia gegenüber den Normalzahlen, die nach Cappezzuoli¹⁾ 1,14:100 beträgt. Ich fand z. B. im Humerus von Nr. 3:

MgO 0,00965
CaO 0,47840

oder 2,01:100. In der Ulna von Nr. 4 fand ich andere Werte: 6:100.

Unter Fluorzufuhr findet also eine Chlor- und Kalkverdrängung aus dem Knochen statt. Das Chlor geht wahrscheinlich als Chlorcalcium oder CaCl_2 -Albuminverbindung ins Blut und wird dabei bis zur Chlorverarmung ausgeschieden. Ich kann dabei nicht angeben, ob Chlorverlust und Kalkverlust parallel gehen. Dies ist bei den elektiven Eigenschaften der sezernierenden Epithelien auch durchaus nicht notwendig. Die Kalkausscheidung ist jedenfalls nur indirekt auf die Fluorzufuhr zurückzuführen, und auch die Chloraustreibung kann nur zum

¹⁾ Diese Zeitschr. 14, 355 bis 356, 1909.

Teil auf der stärkeren Affinität des Fluors zum Calcium beruhen. Wir haben es hier mit einer vitalen Eigenschaft zu tun, mit einer Funktion der lebenden Zellen. So wird der Knochen aus dem Gebiet der reinen Chemie entrückt und es treten Probleme auf, an deren Lösung vorläufig kaum zu denken ist.

Wir haben außer den Mineralien der Knochenerde eine lebendige Substanz mit vielen Funktionen. Die Knochenzellen bauen den Knochen auf, sie lagern Kalk ab in komplizierten Molekülen — sie speichern Vorratskalk auf, in sich und um sich herum (in die kollagene Substanz) —, sie bauen aber auch wieder ab, räumen Knochensubstanz weg, wo sie nicht nötig ist. Die Ca-Ionenkonzentration scheint einen Einfluß auf die Funktion der Knochenzellen zu haben. Fritsch¹⁾ fand, daß bei CaCl₂-Verabreichung in 10 Tagen $\frac{2}{3}$ des Calciums zurückgehalten werden. Dauert aber die Kalkzufuhr länger an, dann tritt Entkalkung ein. Diese führte bei seinen Versuchstieren zu osteomalacischen Erscheinungen und starker Verminderung des Skelettkalkes. Das Blut enthielt dabei bis zu 0,156⁰/₁₀₀ Ca. Der Abbau wird nach Morpurgo und Satta²⁾ durch eine thermolabile Substanz besorgt, die bei 37° doppelt so viel Kalksalze aus zerriebener Knochenmasse löst als bei Kälte oder bei 56°. Wahrscheinlich ist dies ein Ferment, produziert von den Knochenzellen, und es wäre wohl möglich, daß auch die Kalkapposition durch einen ähnlichen Körper veranlaßt würde. Betrachten wir Schnitte des Knochenmarks der Fluortiere, so finden wir deutliche Zeichen subakuter Entzündung, einen Überschuß an polynucleären Leukocytenformen, starke Vermehrung der Riesenzellen. Makroskopisch fällt die intensiv rote Farbe auf, der geringe Fettgehalt, die rötliche Färbung einzelner Gelenke. Schon früher wurde die auffallende Ruhe der Fluortiere erwähnt — man hielt dies für eine Beeinflussung der Nervensubstanz. Mein Fluormensch erklärte mir das, was die Kaninchen nicht mitteilen können: er hatte heftige Schmerzen in den Knochen, besonders in den großen Röhrenknochen, doch auch in Sternum und Wirbelsäule. Deswegen vermeiden die Fluortiere jede stärkere Bewegung, obwohl sie ganz gut Sprünge

¹⁾ Contribution à l'étude de la chaux etc. Thèse de Nancy 1909.

²⁾ Arch. ital. de Biol. 1908, 380.

ausführen können. Das Fluor, als organische Calciumverbindung (?) im Knochen abgelagert, wirkt als starker Reiz auf die lebende Substanz und regt Resorptionsvorgänge an. Wahrscheinlich wird viel vom eigentlichen Knochen resorbiert, wenigstens spricht die große Anzahl der Osteoclasten dafür. Ausgeschieden und fortgeschwemmt wird aber aus dem Vorratsquantum, das einen Teil des resorbierten und den apponierten Kalk enthält.

Daß resorptive Vorgänge die Fluorknochen verändern, ersehen wir an der Untersuchung der Femora dextra.

	Frischgewicht	Trockengewicht	Trockengew. in Proz. des Frischgew.	Fettfrei	In Proz. des Frischgew.	Fett g
Kan. 1 (137 Tage alt)	8,625	5,263	61,2	5,017	58,1	0,246
" 2 (148 " ") normal	10,815	7,076	67,2	6,5254	60,3	0,5506
Die älteren Tiere:						
Kan. 3 (162 Tage alt)	10,703	7,1335	66,6			
" 4 (168 " ")	10,495	7,102	67,6			
" 5 (169 " ") normal	9,456	6,726	71,1			

Auch das spezifische Gewicht der Knochen zeigt einen Unterschied, obwohl die normalen Knochen mehr Fett enthalten, also leichter sein sollten. Die Femora 4 und 5 wurden unmittelbar nach Bestimmung des Frischgewichtes an dünnstem Kupferdraht aufgehängt und in destilliertem Wasser von 15° gewogen.

Nr. 4. Femur, wiegt im Wasser 3,189, hat also spez. Gew. 1,436
 " 5. " (norm.) " " " 3,007, " " " " 1,450

Ich muß noch eine Bemerkung hinzufügen, betreffend die Chlorzahlen meiner Kaninchen. Abderhalden hat etwas höhere Normalzahlen für Kaninchen gefunden. Meine Kaninchen werden mit Heu, Gemüseabfällen, etwas Milch und Quellwasser (von 14 Härtegraden) gefüttert. Das Heu stammt von einer Wiese, die nicht landwirtschaftlich benutzt und seit Jahren nicht gedüngt wird, also keine Chlorzufuhr erhält. Die Tiere sind somit offenbar auf ein Chlorminimum gestellt, d. h. $2,4\frac{0}{100}$ Cl im Blute. — Auf stärkere Fluordosen scheint eine vorübergehende Kalkretention einzutreten; vielleicht wird der leichter lösliche Vorratskalk für kurze Zeit als Fluorocalcium gefällt und von

den Kolloiden als solcher zurückgehalten (s. Blutkalkanalyse Kan. Nr. 4). Der nicht festgebundene Kalk im Knochen spielt, vielleicht als CaCl_2 , oder als Chlorcalciumprotein, eine in anderer Weise sehr wichtige Rolle: Ist Mangel an NaCl vorhanden, so dürfte ein Teil des CaCl_2 aus den Knochen in die Blutbahn gelangen, z. B. nach schweren Krankheiten. Dann ist nach meiner Ansicht die Gefahr der Venenthrombose vorhanden, besonders wenn infolge der Krankheit Endothelveränderungen in den Gefäßen bestehen. Reichliche Zufuhr von NaCl zum Blute, per os, per rectum, subcutan, intravenös, kann diesen Einbruch des Reservkalkes in die Blutmasse verhüten, indem osmotische Verhältnisse entstehen, die für vikariierende Chloridzufuhr keine Veranlassung geben. Dann geht auch, wie ich mehrfach konstatieren konnte, die Gerinnbarkeit des Blutes auf das richtige Maß zurück. Nach demselben Prinzip ist bei meinem Fluormenschen die Koagulabilität rasch zurückgegangen, obwohl das Fluor wohl noch lange im Körper blieb.

Als Resultat meiner Untersuchung möchte ich folgendes hervorheben:

1. Chronische Zufuhr kleiner Fluornatriumdosen, 1 bis 2 mg pro Kilogramm Körpergewicht, ruft ein erkennbares Krankheitsbild hervor: erhöhte Gerinnbarkeit des Blutes, Neigung zu Venenthrombosen und Knochenschmerzen infolge von Reizung des Knochenmarks.

2. Die chemische Seite dieses Krankheitsbildes ist Chlorverlust und Kalkverlust des Knochens, wohl beide in der Hauptsache verursacht durch die resorbierende Funktion der gereizten Knochenzellen; die Chlorausscheidung daneben auch hervorgerufen durch die Differenz in der Affinität zwischen Chlor und Fluor.

3. Das Chlor wird hauptsächlich durch die Nieren abgeschieden, der Kalk durch Urin und Faeces. Der Organismus kann dabei so chlorarm werden, daß der Urin nur Bruchteile von 1 zu 1000 enthält. In diesem Stadium ist im Blute ein merklicher Teil des Chlors an Calcium gebunden und die Gerinnbarkeit des Blutes dadurch erhöht.

4. Neben der nachweisbaren Verarmung des Knochens an löslichen Kalksalzen und an Chlor zeigen die Fluortiere einen beträchtlichen Verlust im Fettgehalte der Knochen. Mikro-

skopisch erklärt sich dieser Verlust durch Verdrängung der Fettzellen des Knochenmarks durch lymphoide Elemente. Da aber trotzdem das spezifische Gewicht der Fluorknochen niedriger ist als der normalen, so muß auch eine ganz beträchtliche Resorption des eigentlichen Knochenkalkes usw. stattgefunden haben.

5. Fluorpräparate, in kleiner Dose chronisch zugeführt, sind giftig, selbst bis unter 1 mg per Tag pro Kilogramm Körpergewicht, und sollten sowohl für die Ernährung von Menschen als die Fütterung von Schlacht- und Milchvieh gänzlich ausgeschaltet werden.

Beitrag zur Kenntnis des Pepsins.

Von

D. Lénard.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Kgl. Pathologischen
Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 14. Januar 1914.)

Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Mehrzahl der Fermente durch Alkalien und Säuren mehr oder weniger geschädigt werden können, und daß diese schädigende Wirkung besonders stark von den Substanzen ausgeübt wird, deren Reaktion eine der optimalen entgegengesetzte ist. So wird z. B. das in saurer Lösung am besten wirkende Pepsin am ehesten von Alkalien beeinträchtigt, das in schwach alkalischer Reaktion am besten wirksame Trypsin von Säuren.

Beim Pepsin hat man nun beobachtet, daß, wenn man es mit Alkali (Sodalösung) gewisse Zeit zusammenbringt, dann neutralisiert, mit Salzsäure ansäuert und darauf seine Wirkung prüft, es vollkommen wirkungslos geworden ist. Diese Beobachtung wurde zuerst von Kühne¹⁾ und von Langley²⁾ gemacht und von letzterem dahin erweitert, daß das Pepsinogen dem Alkali gegenüber viel widerstandsfähiger ist als Pepsin, und daß auch das Labferment von Sodalösungen zerstört wird. Nun hat Pawlow³⁾ aber zeigen können, daß die Behandlung des Pepsins mit Alkali das Ferment zwar vollkommen wirkungslos macht, daß es aber doch gelingt, das Pepsin teilweise wieder wirkungsfähig zu machen, wenn man die alkalische Pepsinlösung neu-

¹⁾ Kühne, Verhandl. d. naturh. med. Vereins, S. 193. Heidelberg 1877.

²⁾ Langley, Journ. of Physiol. 3, 246, 1880.

³⁾ Pawlow und Parastschuck, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 415, 1904.

tralisiert und in diesem neutralen Stadium eine Zeitlang stehen läßt. Wenn dann die Pepsinlösung mit der entsprechenden Menge Salzsäure angesäuert wird, ist sie wieder imstande Eiweiß zu verdauen. Diesen Vorgang der Regenerierung von Pepsin hat Tichomirow¹⁾ eingehend studiert und ist u. a. zu dem Resultat gekommen, daß man eine alkalische Pepsinlösung wieder gut wirksam machen kann, wenn man $\frac{4}{5}$ der Alkaliescenz beseitigt, den ganz schwach alkalischen Saft 4 bis 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehen läßt und nun die Lösung mit Salzsäure schwach ansäuert. Auf diese Weise gelang es ihm, bestenfalls $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Pepsinmenge wieder wirkungsfähig zu machen.

Es lag nun nahe, zu untersuchen, ob sich das Trypsin analog verhält wie das Pepsin, d. h. ob es gelingt, eine Trypsinlösung, die durch Ansäuern mit irgendeiner Säure unwirksam gemacht worden war, durch geeignete Maßnahmen wieder wirkungsfähig zu machen. Diese Maßnahmen konnten nur darin bestehen, daß man die Säure ganz oder teilweise neutralisierte, die neutrale Lösung bei Zimmertemperatur stehen ließ und dann mit Soda schwach alkalisch machte. In zahlreichen Versuchen wurde teils an frischem aktiven Hundepankreassaft, teils an frisch hergestellten Trypsinlösungen aus käuflichen Pankreaspräparaten in der entsprechenden Weise vorgegangen. Trotzdem die Quantität der Säure und die Zeit ihrer Einwirkung, die Neutralitätspause und die Menge des Alkali nach den verschiedensten Richtungen hin variiert wurde, gelang es in keinem einzigen Falle, das durch Säure einmal inaktivierte Trypsin zu regenerieren. Aus meinen ausgedehnten Protokollen will ich als Beleg nur einen Versuch mitteilen.

20 ccm frischer, vorher genau neutralisierter Pankreassaft vom Hund wird mit 20 ccm $\frac{1}{10}$ -Normal-Salzsäure versetzt und in 5 Portionen zu 8 ccm geteilt. Nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird die erste Portion mit der entsprechenden $\frac{1}{10}$ -Normal-Natronlauge genau neutralisiert, die zweite Portion nur zu $\frac{4}{5}$ neutralisiert, die dritte nur zu $\frac{2}{5}$ neutralisiert, die vierte Portion wird genau neutralisiert und sofort durch Zusatz von 2 Tropfen 10%iger Sodalösung schwach alkalisch gemacht und die fünfte Portion nach dem Neutralisieren mit 4 Tropfen

¹⁾ Tichomirow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55, 107, 1908.

10%iger Sodalösung schwach alkalisiert. In diesem Zustande bleiben sämtliche 5 Portionen bei Zimmertemperatur stehen. Nach 4, nach 8 und nach 24 Stunden wird jeder Portion eine Probe entnommen, diese auf den Alkaleszenzgrad der 5. Probe gebracht und in jeder Probe der Trypsingehalt quantitativ mit der Fuld-Großschen Methode¹⁾ bestimmt. Das Resultat dieses Versuches ist aus folgender Tabelle ersichtlich.

Tabelle I.

Saftmenge	Port. 1	Port. 2	Port. 3	Port. 4	Port. 5	Nicht vorbehandelter Pankreassaft	
untersucht nach 4 Std.	1,00	klar	klar	klar	klar	klar	klar
	0,64	"	"	"	"	"	"
	0,40	"	"	"	"	"	"
	0,25	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb	"
	0,16	"	"	"	"	"	"
	0,10	"	"	"	"	"	schwach trüb
untersucht nach 8 Std.	1,00	klar	klar	klar	klar	klar	klar
	0,64	"	"	"	"	"	"
	0,40	"	"	trüb	"	"	"
	0,25	trüb	trüb	"	trüb	trüb	"
	0,16	"	"	"	"	"	"
	0,10	"	"	"	"	"	schwach trüb
untersucht nach 24 Std.	1,00	klar	klar	klar	klar	klar	klar
	0,64	"	"	"	"	"	"
	0,40	"	trüb	trüb	"	"	"
	0,25	trüb	"	"	trüb	trüb	"
	0,16	"	"	"	"	"	"
	0,10	"	"	"	"	"	schwach trüb

Aus der Tabelle geht hervor, daß von dem durch die Salzsäure zerstörten Anteil an Trypsin weder durch die Vorbehandlung mit Alkali noch durch die mit Säure auch nicht die geringste Spur wieder hergestellt werden konnte. Vielmehr ergab sich, daß die sauren Portionen (2, 3) bei längerem Stehen noch weiter geschädigt wurden.

Nach diesen rein negativ verlaufenden Versuchen mit Trypsin wurden die Versuche von Tichomirow mit Pepsin wieder aufgenommen, in der Absicht, festzustellen, ob jede Pepsinart sich so verhält, wie das von Tichomirow untersuchte Hundepepsin.

Bezüglich der von mir angewandten Methodik sei vorausgeschickt, daß ich mich zur quantitativen Bestimmung des

¹⁾ s. Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden, S. 187.

Pepsins nicht der Mettschen Methode bedient habe, sondern der von Fuld angegebenen Edestinprobe, weil mir durch sie eine größere Genauigkeit der Resultate gewährleistet schien. Denn es kann keinem Zweifel unterliegen, daß die Fuld'sche Methode der von Mett angegebenen weit überlegen ist.

Die Verwendung der Fuld'schen Methode machte es nun aber erforderlich, zunächst festzustellen, welcher Aciditätsgrad für ein bestimmtes Pepsin der optimale ist, d. h. bei welcher Salzsäurekonzentration die Verdauung einer bestimmten Pepsinart am intensivsten ist. Fuld und Levisson¹⁾, die ausschließlich mit ausgehebertem menschlichen Mageninhalt arbeiteten, geben an, daß man bei einer Salzsäureacidität von 30, also bei 0,12% HCl arbeiten soll. Diese Vorschrift würde also nur für menschliches Pepsin gelten, nicht aber auch für tierisches. Eine Nachprüfung der optimalen Reaktion für die Edestinprobe war um so eher erforderlich, als Johanne Christiansen²⁾ vor kurzem mitgeteilt hatte, daß bei Verwendung der Mettschen Methode die verschiedenen Pepsinarten ein verschiedenes Aciditätsoptimum besitzen. So liegt das Optimum für menschliches Pepsin bei einer Acidität von 20 bis 33, und für tierisches Pepsin zwischen 50 und 75.

Ich habe nun für das Pepsin vom Menschen, vom Schwein und vom Hund die optimale Salzsäurekonzentration mittels der Edestinprobe festgestellt und bin in der Weise vorgegangen, daß ich von jeder Pepsinart Versuchsreihen mit verschieden starkem Salzsäuregehalt anstellte. Und zwar wurden folgende Aciditäten geprüft: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50. Natürlich wurde in jeder Versuchsreihe genau darauf geachtet, daß alle zum Versuch verwandten Lösungen genau die gleiche Acidität besaßen. Wenn z. B. die Acidität 25 geprüft wurde, so wurde sowohl die Edestinlösung mit einer Salzsäure von der Acidität 25 hergestellt, sowie zur Fermentverdünnung, resp. zum Ausgleich der Flüssigkeitsvolumina eine Salzsäurelösung von der Acidität von 25 verwandt. Für die Untersuchung von menschlichem Pepsin verwandte ich ausgeheberten Mageninhalt, der vor dem Gebrauch filtriert wurde; als Hundepepsin kam reiner Hundemagensaft zur Verwendung, der aus einem Magen-

¹⁾ Fuld und Levisson, diese Zeitschr. 6, 473, 1907.

²⁾ J. Christiansen, diese Zeitschr. 46, 257, 1912.

blindsack nach Pawlow stammte, und als Schweinepepsin das äußerst wirksame Präparat „Glycerinum pepticum“ von Fairchild Brothers & Forster, London.

Das Ergebnis aller dieser Versuche stelle ich in folgenden drei Tabellen zusammen.

Tabelle II.
Menschliches Pepsin. (Ausgeheberter Mageninhalt.)

Fermentmenge	Acid. 25	Acid. 30	Acid. 35	Acid. 40	Acid. 45	Acid. 50
1,00	klar	klar	klar	klar	klar	klar
0,64	"	"	"	"	"	"
0,40	"	"	"	"	"	"
0,25	schw. trüb	schw. trüb	schw. trüb	"	"	"
0,16	"	"	trüb	schw. trüb	schw. opal.	schw. opal.
0,10	"	"	"	"	opalesc.	opalesc.

Demnach liegt für menschliches Pepsin das Optimum bei einer Acidität von 45 bis 50.

Tabelle III.
Hundepepsin.

Fermentmenge	Acid. 20	Acid. 25	Acid. 30	Acid. 35	Acid. 40	Acid. 45	Acid. 50
1,00	klar	klar	klar	klar	klar	klar	klar
0,64	"	"	"	"	"	"	"
0,40	schw. trüb	schw. trüb	"	"	"	"	"
0,25	trüb	trüb	"	"	"	"	"
0,16	"	"	"	"	"	"	"
0,10	"	"	schw. trüb	"	opalesc.	schw. trüb	schw. trüb
0,064	"	"	trüb	"	schw. trüb	"	trüb
0,04	"	"	"	schw. trüb	"	trüb	"
0,025	"	"	"	trüb	trüb	"	"

Für Hundepepsin liegt somit das Optimum seiner Wirksamkeit bei einer Acidität von 35.

Tabelle IV.
Schweinepepsin.

Fermentmenge	Acid. 25	Acid. 30	Acid. 35	Acid. 40	Acid. 45
0,0100	klar	klar	klar	klar	klar
0,0064	"	"	"	"	"
0,0040	"	"	schw. trüb	schw. trüb	trüb
0,0025	schw. trüb	schw. trüb	trüb	trüb	"
0,0016	trüb	"	"	"	"
0,0010	"	trüb	"	"	"

Somit ist Schweinepepsin am wirksamsten bei einer Acidität von 30.

Diese meine Befunde stehen im Widerspruch mit den bereits eingangs erwähnten von Johanne Christiansen¹⁾ ermittelten Resultaten. Diese fand nämlich, daß für menschliches Pepsin das Wirkungsoptimum bei einer weit niedrigeren Acidität liegt als für tierisches Pepsin, und zwar verdaute menschliches Pepsin — mit der Mettschen Methode gemessen — am besten bei einer Salzsäureacidität von 20 bis 33, Hundepepsin bei einer Acidität von 50 bis 60 und Schweinepepsin bei einer Acidität von 65 bis 75. Nach meinen Untersuchungen dagegen bedarf menschliches Pepsin bei seiner optimalen Wirkung einer weit höheren Acidität als Hunde- und Schweinepepsin. Worauf dieser Unterschied zwischen meinen Befunden und denen von Christiansen beruht, läßt sich mit Sicherheit schwer entscheiden. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist er in der verschiedenen, von uns verwandten Methodik begründet; definitiven Aufschluß darüber können nur weitere vergleichende Versuche ergeben.

Nach diesen Feststellungen bemühten wir uns, zu entscheiden, ob die von Tichomirow gefundene Tatsache, daß das Pepsin des Hundemagensaftes, das nach der Behandlung mit Alkali unwirksam geworden war, nach teilweiser Neutralisation und späterem Ansäuern mit Salzsäure seine Wirksamkeit zum Teil wiedererlangt, nur dem Hundepepsin zukommt, oder ob auch Pepsin anderer Provenienz sich ebenso verhält.

Zu dem Zweck erschien es uns notwendig, zur Orientierung zunächst einen Versuch mit Hundepepsin auszuführen, unter genauer Innehaltung der von Tichomirow gegebenen Vorschriften.

Versuch 1.

8 ccm neutralisierter Hundemagensaft werden durch Zusatz von 2 ccm NaOH, die 0,1% HCl äquivalent ist, alkalisch gemacht und bleiben in diesem alkalischen Zustande 20 Minuten bei Zimmertemperatur (16°) stehen. Nach Ablauf der Frist wird der alkalische Saft zu $\frac{1}{2}$ neutralisiert, d. h. es werden 1,6 ccm 0,1% HCl zugesetzt, und bleibt hierauf weitere 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Danach wird das Gemisch mit so viel Salzsäure versetzt, daß es eine Acidität von ca. 30 (0,1 bis 0,12%) besitzt und nunmehr das Pepsin nach Mett und nach Fuld und der Labgehalt der Lösung nach Fuld und Blum bestimmt.

¹⁾ l. c. S. 283.

Tabelle V.

	Pepsinbestimmung			Labbestimmung		
	vor der Behandlg.	nach der Behandlg.		vorher	nachher	
Nach Fuld	1,00	klar	klar	1,00	geronnen	geronnen
	0,50	"	"	0,50	"	"
	0,25	"	"	0,25	"	"
	0,125	"	trüb	0,125	"	"
	0,062	"	"	0,062	"	part. geronnen
	0,031	"	"	0,031	"	flüssig
	0,016	trüb	"	0,016	"	"
	0,008	"	"	0,008	part. geronnen	"
				0,004	flüssig	"

Pepsineinheiten vor der Behandlung	64,5
Pepsineinheiten nach der Behandlung	8,0
Labeinheiten vorher	62,5
Labeinheiten nachher	80,0
Verdaute Eiweißsäule in mm (nach Mett):	
vor der Behandlung	10,0
nach der Behandlung	2,0

Aus diesem Versuche geht hervor, daß es in der Tat nach der Vorschrift von Tichomirow gelingt, Hundemagensaft, der vorher durch Behandlung mit Alkali seine peptische und labende Kraft vollkommen eingebüßt hat, zu reaktivieren. Doch war die Wiederherstellung hier nur bis zu ca. $\frac{1}{8}$ der ursprünglichen Wirksamkeit gelungen, gemessen mit der Edestinmethode von Fuld und der Labmethode von Fuld und Blum; nach Mettscher Methode war allerdings der Effekt ein etwas besserer.

Hiernach untersuchten wir Menschenpepsin und Schweinepepsin.

Was zunächst das letztere anbetrifft, so stellten wir uns aus getrocknetem Schweinemagen eine Pepsinlösung in der Weise her, daß wir den getrockneten Magen zerkleinerten und pulverisierten und das Pulver mit 0,2%iger Salzsäure 24 Stunden lang extrahierten. Das so gewonnene Extrakt war stark pepsin- und labhaltig. Ein aliquoter Teil dieses Extrakts wurde neutralisiert; 8 ccm dieses neutralen Extrakts wurden durch Zusatz von 2 ccm NaOH, die 0,1% HCl äquivalent war, alkalisch gemacht und blieben in diesem alkalischen Zustande 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Danach wurden $\frac{4}{8}$ der Alkaliesenz durch Zusatz von 1,6 ccm 0,1%iger Salzsäure be-

seitigt und die noch schwach alkalische Lösung 6 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Nach Ablauf der Frist wurde die Lösung vollkommen neutralisiert und durch Zusatz von $\frac{2}{10}$ -Salzsäure auf eine Acidität von 30 gebracht. Hiernach wurde, wie beim Hundemagensaft, die Pepsinmenge nach Mett und nach Fuld und außerdem die Labmenge quantitativ bestimmt und mit dem nichtbehandelten neutralen Magenextrakt verglichen. Dabei zeigte sich, daß das vorherbehandelte Extrakt Pepsin und Lab nur in Spuren besaß. Nach der Methode von Fuld erhielt es nur 4 Pepsineinheiten und 20 Lab-einheiten, während mit Hilfe der Mettschen Methode überhaupt keine deutliche Pepsinwirkung zu erkennen war. Es hatte also in diesem Falle die von Tichomirow angegebene Versuchsanordnung fast gänzlich versagt.

Deshalb wurde ein zweiter Versuch mit Schweinepepsin ausgeführt und bei diesem zunächst nach dem Alkalisieren in verschiedenen Portionen die Alkaleszenz in folgender Weise ausgeglichen. Eine Portion wurde mit 1 $\frac{0}{10}$ iger Salzsäure bis $\frac{3}{5}$, die zweite bis $\frac{4}{5}$, die dritte bis $\frac{5}{6}$, die vierte bis $\frac{6}{7}$, die fünfte bis $\frac{7}{8}$ neutralisiert und nun sämtliche Portionen 4 Stunden lang bei Zimmertemperatur gehalten. Hiernach wurde mit 1 Teil einer jeden Portion das Pepsin nach Fuld und nach Mett und außerdem die Labmenge bestimmt. Der Rest der einzelnen Portionen blieb noch 2 Stunden länger, also im ganzen 6 Stunden, bei Zimmertemperatur stehen und wurde dann in der gleichen Weise verarbeitet. Das Resultat dieses Versuchs habe ich in folgender Tabelle VI zusammengestellt.

Aus diesem Versuche geht hervor, daß bei $\frac{6}{7}$ Neutralität und sechsständigem Stehen bei Zimmertemperatur die Pepsinwirkung wieder am kräftigsten ist. Das ließ sich sowohl mit der Edestinprobe wie mit dem Mettschen Verfahren sicherstellen. Auch die Labwirkung erlangt unter den gleichen Reaktions- und Zeitbedingungen ihre größte Leistungsfähigkeit, geht also der Pepsinwirkung ganz parallel. Das tritt auch deutlich zutage, wenn man die anderen Versuchsreihen untereinander vergleicht.

Nun hat es sich aber herausgestellt, daß es durchaus nicht in jedem Falle gelingt, eine Schweinepepsinlösung, die man durch Zusatz eines Überschusses von Alkali unwirksam

gemacht hat, zu reaktivieren. Der oben mitgeteilte Versuch hat von 8 Versuchen, die wir teils unter den gleichen, teils unter ähnlichen Versuchsbedingungen ausführten, das beste Resultat ergeben. In 5 Versuchen war das Resultat gänzlich negativ und in 2 Versuchen war nach Rückneutralisation und längerem Stehen bei Zimmertemperatur nur eine ganz geringe Pepsinwirkung wieder zu erkennen.

Tabelle VI.

Nicht vorbehandelt	$\frac{3}{5}$ neutral.		$\frac{4}{5}$ neutral.		$\frac{5}{5}$ neutral.		$\frac{6}{7}$ neutral.		$\frac{7}{8}$ neutral.	
	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.

Pepsin (nach Fuld).

1,00	klar	schw. trüb	schw. trüb	klar	klar	klar	klar	klar	klar	klar	klar
0,64	"	trüb	trüb	schw. trüb	"	"	"	"	"	schw. trüb	"
0,40	"	"	"	trüb	trüb	trüb	trüb	schw. trüb	"	trüb	trüb
0,25	"	"	"	"	"	"	"	trüb	trüb	"	"
0,16	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
0,10	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
0,064	trüb	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
0,04	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"

Pepsin (nach Mett).

[10,5 mm] — | — | — | — | Spur | Spur | 1 mm | 1 mm | Spur | Spur

Lab.

0,100	ger.	ger.	ger.	ger.	ger.	ger.	ger.	ger.	ger.	ger.	ger.
0,064	"	flüssig	flüssig	part. ger.	part. ger.	"	"	"	"	"	"
0,040	"	"	"	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	part. ger.	ger.	etwas ger.	part. ger.
0,025	"	"	"	"	"	"	"	etwas ger.	part. ger.	flüssig	flüssig
0,016	"	"	"	"	"	"	"	flüssig	flüssig	"	"
0,010	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
0,0064	flüssig	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"

Ein ähnliches Resultat ergaben unsere Versuche mit menschlichem Pepsin. Als solches diente uns das Filtrat von ausgehebertem menschlichem Mageninhalt. Dasselbe wurde zunächst genau neutralisiert und dann in der gleichen Weise wie mit dem Hundemagensaft der Versuch ausgeführt, d. h. ein bestimmtes Quantum des neutralen Mageninhaltfiltrates wurde alkalisch gemacht, danach $\frac{4}{5}$ der Alkaleszenz mit 0,1⁰/₀iger Salzsäure wieder ausgeglichen und in diesem schwach alkalischen

Zustand 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hiernach wurde die Lösung mittels verdünnter Salzsäure auf eine Acidität von 45 gebracht und nun das Pepsin mit der Methode von Fuld und von Mett und außerdem auch das Lab bestimmt. Das Resultat war aber ein durchaus negatives; es ließ sich weder Pepsin noch Lab in der Lösung nachweisen. — Ein zweiter Versuch, bei dem nur $\frac{3}{8}$ der Alkaleszenz beseitigt wurde, hatte das gleiche negative Ergebnis.

Hiernach erwies es sich als notwendig, unter Variierung des Alkaleszenzgrades, die Zeit zu ermitteln, die erforderlich ist, um von dem inaktiven Pepsin einen möglichst großen Anteil wieder zu aktivieren. Wir gingen zu dem Zweck in ähnlicher Weise vor wie bei dem oben mitgeteilten Versuch mit Schweinepepsin.

Ein größeres Quantum vorher genau neutralisierten Mageninhalt wurde mit 0,1%iger Natronlauge alkalisch gemacht und in mehrere Portionen geteilt. Nach einer halben Stunde wurde in der ersten Portion $\frac{3}{8}$ der Alkaleszenz beseitigt, in der zweiten $\frac{4}{8}$ der Alkaleszenz, in der dritten $\frac{5}{8}$ der Alkaleszenz, in der vierten $\frac{6}{7}$ und in der fünften $\frac{7}{8}$ der Alkaleszenz beseitigt und sämtliche Portionen bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Verlauf von 4 Stunden wurde allen Portionen ein aliquoter Teil entnommen, dieser neutralisiert und auf eine Acidität von 45 gebracht und nun in allen Lösungen Pepsin und Lab wie oben bestimmt. Nach weiteren 4 Stunden wurde den einzelnen Portionen wieder ein kleines Quantum entnommen, mit ihm ebenso verfahren und nach im ganzen 24 Stunden wurde der Rest der einzelnen Portionen in der gleichen Weise verarbeitet. Das Resultat dieses Versuches geht aus folgender Tabelle VII hervor.

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, gelingt es am besten bei $\frac{7}{8}$ -Neutralisation und nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur, das menschliche Pepsin zu reaktivieren, während $\frac{3}{8}$ - und $\frac{4}{8}$ -Neutralisation, die sich für Hundepepsin so wirksam erwies, so gut wie wirkungslos blieben. Wie beim Pepsin kommt das ebenso auch beim Lab zum Ausdruck. Eine stärkere Neutralisation, wie beispielsweise $\frac{8}{9}$ oder $\frac{9}{10}$ der Alkaleszenz gestaltete das Resultat keinesfalls günstiger, vielmehr wurde mit $\frac{7}{8}$ -Neutralisation stets die optimale Wirkung er-

Tabelle VII.
Pepsin (nach Fuld).

Unvor- behandelt	$\frac{3}{8}$ neutral.			$\frac{4}{8}$ neutral.			$\frac{5}{8}$ neutral.			$\frac{6}{8}$ neutral.			$\frac{7}{8}$ neutral.		
	Stunden			Stunden			Stunden			Stunden			Stunden		
	4	8	24	4	8	24	4	8	24	4	8	24	4	8	24
1,00	klar	trüb	trüb	trüb	schw.	trüb	trüb	schw.	trüb	trüb	opalesc.	opalesc.	trüb	klar	klar
0,64	"	"	"	"	trüb	trüb	"	trüb	trüb	trüb	opalesc.	opalesc.	trüb	klar	klar
0,40	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	schw.	schw.	trüb	opalesc.	schw.
0,25	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb
0,16	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
0,10	trüb	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
8 mm	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	Spur	Spur

nach Mett

Lab.		
Spur	Spur	Spur
1,5 mm	geronn.	geronn.
0,500	ger.	geronn.
0,320	"	"
0,200	"	"
0,125	"	"
0,080	part.	part.
0,050	flüss.	flüss.

zielt. Es sind deshalb die anderen Versuchsanordnungen hier nicht weiter ausgeführt worden.

Auch beim menschlichen Pepsin gelang es wie beim Schweinepepsin nicht immer, das hier mitgeteilte Resultat zu erzielen. Meist war es erheblich schlechter, in einzelnen Fällen sogar gänzlich negativ. Auch hier sind wir nicht in der Lage, eine Erklärung dafür zu geben. Man geht aber wohl nicht fehl, wenn man annimmt, daß in diesen Fällen die in großen Mengen im menschlichen Mageninhalt sich findenden Antikörper schuld an dem negativen Ergebnis sind. Denn man kann sich vorstellen, daß bei der alkalischen Reaktion das im Mageninhalt befindliche Antipepsin mit dem Pepsin eine sofortige Verbindung eingeht, die nachher nicht wieder gesprengt werden kann.

Nun hat Morgenroth¹⁾ gezeigt, daß in manchen Fällen die Verbindung zwischen Pepsin und Antipepsin wieder vollkommen gesprengt wird, wenn man die Lösung ansäuert. Wir haben deshalb, geleitet von diesem Gedanken, auch Versuche in der Weise angestellt, daß wir nach dem 1. Alkalisieren die Lösung neutralisierten, in diesem neutralen Zustand längere Zeit stehen ließen, dann ansäuerten und wieder einige Zeit warteten. Hiernach erst wurde auf Pepsin und Lab untersucht.

Doch erhielten wir hier ein noch schlechteres Resultat als in dem oben mitgeteilten Versuch. Denn es gelang uns in keinem einzigen Falle, Pepsin oder Lab auch nur in Spuren wieder nachzuweisen.

Zusammenfassend geht aus den mitgeteilten Versuchen hervor, daß wenn man Trypsin durch Zusatz von Säure unwirksam macht, es nicht gelingt, durch nachträgliches Neutralisieren und Alkalisieren seine Wirkung auch nur spurenweise wieder zu gewinnen. Beim Pepsin hingegen ist es wohl möglich, das durch Alkali unwirksam gemachte Ferment durch Säurezusatz teilweise wieder zu regenerieren. Doch gelingt das nicht bei allen Pepsinsorten. Das beste Resultat hierbei liefert Hundepepsin, während beim Menschenpepsin und beim

¹⁾ J. Morgenroth, *Gesellsch. d. Charitéärzte*, 25. Sitzung, II., 1909. *Berl. klin. Wochenschr.* 1909, Nr. 16.

Schweinepepsin die Regenerierung nur in wenigen Fällen gelang. Immer aber konnte man beobachten, daß wenn die Pepsinwirkung wieder auftrat, im gleichen Maße auch die Labwirkung zu konstatieren war. Der Parallelismus zwischen Lab und Pepsin war hier stets unverkennbar. — Sodann wurde in Übereinstimmung mit anderen Untersuchern gefunden, daß, um eine optimale Wirkung zu erzielen, die Salzsäurekonzentration für alle Pepsinarten keineswegs die gleiche ist, sondern daß jedes Pepsin sein bestimmtes Salzsäureoptimum besitzt. So liegt das Optimum der Wirkung für menschliches Pepsin bei Anwendung der Edestinprobe bei einer Acidität von 45 bis 50, für Schweinepepsin bei einer Acidität von etwa 30, für Hundepepsin bei einer Acidität von etwa 35.

Über das Pepton. I.

Von

Alessandro Bernardi.

(Aus dem Institut für pharmazeutische und toxikologische Chemie der Universität Bologna.)

(Eingegangen am 14. Januar 1914.)

Wie wir seit langem wissen, liefern die Aminosäuren charakteristische Kupfersalze. Ebenso ist bekannt, daß die Hydrolyse der Proteinstoffe zu einer Spaltung des Moleküls der Eiweißstoffe führt, eine Zerlegung, die einfachere Zersetzungsprodukte erzeugt.

In einer früheren Arbeit¹⁾, in der ich mich mit dem Einfluß des Peptons²⁾ auf die Bestimmung von Traubenzucker beschäftigt habe, und zwar hinsichtlich der Reduktionskraft des letzteren auf Fehlingsche Lösung, habe ich bemerkt, daß das Reduktionsvermögen des Traubenzuckers bei Gegenwart von Pepton nicht genau festgestellt werden kann, da die erhaltene Kupferoxydulmenge erheblich vermehrt wird. Ferner habe ich nachgewiesen, daß die Natur des Reduktionsmittels keinen Einfluß auf diese Zunahme ausübt. Und da, wie bekannt, die Fehlingsche Lösung durch Pepton an sich keine Reduktion erfährt, sondern nur die Biuretreaktion gibt, lag es nahe anzunehmen, daß die Gewichtszunahme des Kupferoxyduls auf eine Beimengung von Kupferverbindungen organischer Stoffe oder auf Kupfersulfid zurückzuführen sei, welches letzteres von Pepton erzeugt werden kann.

Hierfür sprechen könnte der Umstand, daß aus Pepton enthaltenden Flüssigkeiten erhaltenes Kupferoxydul nicht eine

¹⁾ A. Bernardi, diese Zeitschr. 41, 160.

²⁾ Witte-Pepton.

schöne rote Farbe zeigt, sondern braun ist. Die Hypothese von der Sulfidbildung ist jedoch ausgeschlossen, da eine mit Natriumhydratlösung von der Konzentration der Fehlingschen Mischung gekochte Peptonlösung kaum bemerkbare Spuren von Sulfid erzeugt. Die Ergebnisse der früheren Versuche, wo man das gebildete Kupferoxydul in Kupferrhodanür (Cuprorhodanid) überführte, scheinen darauf hinzuweisen, daß sich die Vermehrung eher mechanisch mitgerissenen, organischen Stoffen zuschreiben läßt, als einem besonderen Metallderivat.

Ich habe bereits früher (l. c.) die Bildung einer schwärzlichen, pechartigen, sich in Wasser mit schöner violetter Färbung löslichen Substanz beschrieben. Sie bildet sich, wenn man eine wässrige, stark konzentrierte Peptonlösung, die mit 100 ccm frisch bereiteter Fehlingscher Lösung gekocht ist, mehrere Wochen sich selbst überläßt. Die Substanz ist wahrscheinlich das Kupfersalz einer organischen Verbindung, die jedoch rein darzustellen uns bisher nicht gelungen ist. Sie soll den Gegenstand weiterer Studien bilden.

Bei der Aufspaltung des Peptons habe ich die von Heintz¹⁾ vorgeschlagene und schon von Bruni und Fornara²⁾ befolgte Methode angewendet, um zu sehen, ob eine seiner Komponenten mit Kupfer eine organische Metallverbindung gibt.

Aus den unten näher zu beschreibenden Versuchen läßt sich folgendes zusammenfassend entnehmen:

1. Durch geeignete Behandlung einer Witte-Peptonlösung mit Kupferhydrat ist es möglich, ein Produkt zu erlangen, dessen charakteristische chemische Eigenschaften von denen des Peptons, aus dem es hervorgegangen ist, stark abweichen.

2. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß man aus dem Witte-Pepton einen Bestandteil von ganz bestimmter chemischer Natur isolieren kann.

Experimenteller Teil.

Einer Bariumhydratlösung von bekanntem Gehalt wurde die entsprechende Menge gelösten Kupfersulfats zugesetzt, wodurch man eine Mischung von Kupferhydrat mit Bariumsulfat in

¹⁾ Lieb. Ann. 198, 49.

²⁾ Gazz. Chim. It. 2, 519, 1904.

destilliertem Wasser erhielt. Diese Mischung wurde im Wasserbad leicht erwärmt und mit einer größeren Menge 5%iger Lösung von gewöhnlichem Witte-Pepton versetzt. Die Erwärmung auf dem Wasserbade wurde ein paar Stunden fortgesetzt und hierauf mittels Sandbad erhöht, bis die Lösung eine schöne, ausgesprochen dunkelblaue Färbung zeigte. Nachdem man sie filtriert hatte, schied sich eine schmutziggelbe Fällung daraus ab.

Diese im Wasserbade weitgehend konzentrierte Flüssigkeit gießt man unter beständigem Schütteln in dünnem Strahl in absoluten Alkohol. Dabei fällt eine pulverige amorphe Substanz von blauer Färbung reichlich aus, die eine Nacht in absolutem Alkohol verbleibt. Dann wird sie unter der Luftpumpe rasch abgesaugt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Zwecks Reinigung wird sie in wenig Wasser aufgenommen und mit absolutem Alkohol mehrfach gefällt. Diesen Prozeß wiederholt man, bis sich die Substanz ohne Rückstand in Wasser löst. So gereinigt, bleibt das Produkt noch eine Nacht unter absolutem Alkohol und wird dann so rasch als möglich an der Luftpumpe abgesaugt, da sie sich an der Luft mit großer Leichtigkeit verändert. Mit absolutem Alkohol gewaschen, trocknet man sie abermals über Schwefelsäure im Vakuum, denn in trockenem Zustande widersteht diese Substanz jeder Einwirkung der Luft.

In kaltem Wasser ist sie stark löslich. Sie gibt die Schwefelbleiprobe und zeigt wechselnde Aschenmenge, und zwar hängt dieselbe von dem erreichten Reinigungsgrad ab. Während das als Ausgangsmaterial benutzte Pepton 1,55% Asche enthielt, ergab gesagte Substanz 0,4 bis 1,41%.

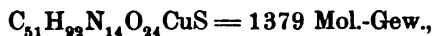
Die angestellten Analysen sind auf aschenfreie Substanz berechnet und wurden mit dem bestgereinigten Produkt ausgeführt. Das Kupfer wurde in Form von Kupferrhodanür (Cuprorhodanid) bestimmt und der Kohlenstoff durch Oxydation der Substanz mit Chromsäure nach der Methode von Messinger¹⁾ ermittelt.

Folgende Tabelle enthält die gewonnenen Analysenresultate:

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 21, 2910, 1888; 23, 2756, 1890.

Darstellung	Angewandte Substanz g	CO ₂ g	C gefunden %/o	H ₂ O g	H gefunden %/o	Cu(CNS) g	Cu gefunden %/o	N	N gefunden %/o	BaSO ₄ g	S gefunden %/o
I	0,1442 0,2398	—	—	—	—	—	—	17,6 ccm (21°, 761 mm)	13,91	—	—
II	0,2636 0,1832 0,1804	—	—	0,1604 0,1042	6,76 6,38	—	—	22,4 ccm (22°, 760 mm)	—	—	—
III	0,1795	—	—	—	—	0,0156	4,54	—	—	—	—
IV	0,2355 -0,1501 0,2363	—	—	0,1488	7,02	—	—	17,4 ccm (12°, 768 mm)	13,90	—	—
V	0,2842 0,2188 0,1633 0,2347 0,1881	0,4686 0,3514	44,96 44,86	—	—	—	—	—	—	—	—
VI	0,2501 0,1998	0,4076	44,44	—	—	—	—	23 ccm (10°, 764,5 mm)	13,86	—	—
VII	0,1965 0,2960	0,4890	45,12	—	—	—	—	23 ccm (10°, 759,5 mm)	14,00	—	—
		Mittel 44,85		Mittel 6,72		Mittel 4,58		Mittel 13,94		Mittel 2,36	

Als Mittel der gefundenen Mengen erhält man eine sehr komplizierte Formel:



deren Zusammensetzung den oben angegebenen Ergebnissen der Analysen sehr genau entspricht:

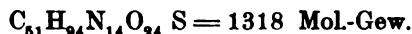
	Berechnet		Gefunden
	%		%
C	44,38	C	44,85
H	6,67	H	6,72
N	14,21	N	13,94
S	2,32	S	2,36
Cu	4,57	Cu	4,58

Die kochende wässrige Lösung dieser Substanz wurde behufs Ausscheidung des Kupfers mit Schwefelwasserstoffgas gesättigt. Die filtrierte Flüssigkeit war klar und von gelber Färbung. Sie wurde im Wasserbad bis zur Sirupdichte eingengt, in dünnem Strahl unter beständigem Schütteln in absoluten Alkohol gegossen. Es wurde eine amorphe, gelbliche Substanz gefällt, die, nachdem sie 12 Stunden unter absolutem Alkohol belassen, an der Luftpumpe rasch abgesaugt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurde.

Der analytische Befund war folgender:

			Gefunden
0,3782 g Substanz	ergaben	0,6452 g CO ₂	C 46,52%
0,2734 g	" "	0,4718 g CO ₂	C 46,62%
0,1652 g	" "	21 ccm N (15°, 756 mm)	N 14,80%
0,2350 g	" "	0,0402 BaSO ₄	S 2,32%

Auf Grund dieser Ergebnisse erhalten wir die Formel:



Daraus berechnen sich:

C	46,43%	N	14,87%	S	2,42%
---	--------	---	--------	---	-------

Auch bei der Berechnung der Analyse dieser kupferfreien Substanz wurde die Asche in Abzug gebracht.

Dieser Proteinstoff löst sich unter Gelbfärbung in kaltem Wasser sehr leicht. Zu den reagensfreien Albumosen und Pepton verhält sie sich anders als das ursprünglich verwendete Witte-Pepton.

Das geht aus der folgenden Übersichtstabelle hervor:

	Reaktionen von wässriger Lösung des	
	Witte-Peptons	kupferfreien Protein-derivats
Mit Essigsäure und konz. Chlornatriumlösung	Die Lösung trübt sich, wird bei Erwärmen nicht ganz klar	Keine Trübung
Mit konz. Salpetersäure	Die Lösung trübt sich, die Trübung verschwindet bei einem Überschuß der Säure wieder. Xanthoproteinreaktion positiv	Keine Trübung. Xanthoproteinreaktion positiv
Mit Essigsäure und Ferrocyanalkiumlösung	Starke Trübung, die bei Erwärmung schwindet	Keine Trübung
Biuretkreaktion	Positiv	Positiv, sehr stark, mit intensiv violetter Färbung
Millons Reaktion	Positiv	Positiv, sehr stark
Mit Quecksilberchlorid, Tanninlösung-Salzsäure und Phosphorwolframsäure	Unlöslicher Niederschlag	Unlöslicher Niederschlag

Mit der wässrigen Lösung dieses Proteinderivats erhält man keine Reduktion von Fehlingscher Mischung.

Das verschiedenartige Verhalten oben genannten Reagenzien gegenüber und hauptsächlich die Nichtfällbarkeit durch Ferrocyanalkium und Chlornatrium in Gegenwart von Essigsäure und durch konz. Salpetersäure läßt die Annahme zu, daß der in beschriebener Weise aus dem gewöhnlichen Witte-Pepton isolierte Proteinabkömmling ein reines, albumosenfreies Pepton sei¹⁾.

In bezug auf letzteres und ganz besonders über die Zerlegung der Substanz sind weitere Studien im Gange.

¹⁾ Salkowski, Praktikum S. 117ff.

Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe. III. Über die Natur der verschiedenartigen Hemmungen der Fermentwirkungen.

Von

L. Michaelis und P. Rona.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses am Urban,
Berlin.)

(Eingegangen am 12. Januar 1914.)

Mit 2 Figuren im Text.

I.

Neben der ausschlaggebenden Bedeutung der Konzentration der H^+ - bzw. OH^- -Ionen auf die Wirkung der Fermente muß auch der mehr oder minder bemerkenswerte Einfluß anderer Stoffe, Elektrolyte wie Nichtelektrolyte, auf diese in Betracht gezogen werden. Um das Wesen dieses Einflusses, der fast ausnahmslos in einer Hemmung der Fermentwirkung besteht, zu übersehen, gehen wir von einigen Annahmen aus, die in der Lehre von den Fermenten sich bewährt haben, und zu deren Sicherung wir früher experimentelle Beiträge erbracht haben.

Dies sind die folgenden Annahmen:

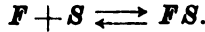
1. Das Ferment F verbindet sich mit seinem spaltbaren Substrat S zu einer Verbindung, die wir als Ferment-Substratverbindung FS bezeichnen werden.

2. Diese Verbindung zerfällt nach den Gesetzen der monomolekularen Reaktion in die Produkte der Hydrolyse und freies Ferment.

3. Zum Ferment hat nicht nur das spaltbare Substrat eine Affinität, sondern auch manche andere Stoffe, die überhaupt nicht hydrolysierbar sind, und bei denen daher auch die Bindung des Fermentes nicht zur Spaltung führt. Hierher

gehören vor allem manche Spaltprodukte des fermentativen Prozesses.

Die erste Annahme läßt sich symbolisch ausdrücken:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion ist nach dem Massenwirkungsgesetz dadurch vorgeschrieben, daß

$$\frac{[F] \cdot [S]}{[FS]} = k \dots \dots \dots (1)$$

k ist die „Dissoziationskonstante“ dieser Verbindung, bzw. $\frac{1}{k}$ die „Affinitätskonstante“ derselben.

Die zweite Annahme läßt sich folgendermaßen formulieren:

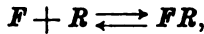
Die jeweilige Zerfallsgeschwindigkeit v des Substrats ist proportional der Konzentration der Ferment-Substratverbindung

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = c \cdot [FS],$$

wo t die Zeit, c ein Proportionalitätsfaktor, die „Geschwindigkeitskonstante“ ist; oder da $[FS] = \frac{1}{k} \cdot [F] \cdot [S]$,

$$v = \frac{c}{k} \cdot [F] \cdot [S] \dots \dots \dots (2)$$

Die dritte Annahme würde sich formulieren lassen:



wo R der bindungsfähige hemmende Stoff, FR seine Verbindung mit dem Ferment ist. Das Gleichgewicht dieser Reaktion ist gegeben durch

$$\frac{[F] \cdot [R]}{[FR]} = k_1, \dots \dots \dots (3)$$

wo k_1 die Dissoziationskonstante dieser Verbindung, bzw. $\frac{1}{k_1}$ die Affinitätskonstante des Stoffes zum Ferment ist.

Befindet sich nun in der Lösung neben dem Ferment gleichzeitig das spaltbare Substrat in der Konzentration $[S]$ und ein anderer Stoff mit Affinität zum Ferment in der Konzentration $[R]$, so tritt eine Verteilung des Fermentes zwischen den beiden Stoffen ein, und die Konzentration von $[FS]$ ist kleiner als ohne Anwesenheit des fremden Stoffes. Daher ist

auch die Zerfallsgeschwindigkeit kleiner, und der fremde Stoff hemmt die Fermentwirkung. Diese Fermenthemmung beruht also auf der Anwesenheit eines Stoffes, der eine Affinität zum Ferment hat.

Ein anderer Mechanismus der Hemmung wäre der folgende: In der Formel (2) ist c , die Geschwindigkeitskonstante, eine Größe, die selbst bei konstanter Temperatur von der Natur des Lösungsmittels in einer nicht genau erkannten Weise (aber in den von uns betrachteten Fällen sicher eindeutig und umkehrbar) abhängig ist. Bekanntlich wissen wir über die Abhängigkeit dieser Geschwindigkeitskonstante von der Natur des Lösungsmittels noch recht wenig; wir wissen nur, daß eine Reaktion, die in Wasser schnell verläuft, in Alkohol langsam verlaufen kann, u. dgl. So ist es auch denkbar, daß manche Stoffe die Geschwindigkeit einer Fermentreaktion dadurch beeinflussen, daß sie, ohne eine Affinität zum Ferment zu haben, die „Natur des Lösungsmittels“ derartig verändern, daß die Geschwindigkeitskonstante c eine andere wird.

Wir wollen versuchen, vorläufig mit der Annahme nur dieser zwei Mechanismen der Hemmung auszukommen¹⁾.

Wir müssen nun nach Kriterien suchen, an denen wir erkennen können, ob ein hemmender Stoff durch Affinität zum Ferment oder durch Änderung der Zerfallsgeschwindigkeit hemmt.

Beginnen wir mit dem zweiten Fall. Ein hemmender Stoff würde dabei keine andere Änderung hervorrufen, als daß er in der Formel

$$v = \frac{c}{k} \cdot [F] \cdot [S]$$

den Wert c der Geschwindigkeitskonstante verändert. Diese Änderung wird um so größer sein, je mehr von dem hemmen-

¹⁾ Eine dritte Möglichkeit der Hemmung besteht in folgendem. Der hemmende Stoff, wenn er ein Spaltprodukt des fermentativen Prozesses darstellt, könnte das thermodynamische Gleichgewicht zwischen dem spaltbaren Substrat und den Spaltprodukten verschieben. Solche Fälle kommen zweifellos vor, wir glauben sie aber für unsere Fälle vernachlässigen zu dürfen, weil in wässriger verdünnter Lösung die Reaktion α -Methylglucosid \rightleftharpoons Glucose + Methylalkohol selbst bei mäßigem Überschuß eines der Spaltprodukte von links nach rechts praktisch zu Ende verläuft.

den Stoff zugegen ist, ohne daß wir im voraus die hemmende Größe als Funktion der Konzentration des hemmenden Stoffes genau angeben können. Bei gegebener Konzentration des hemmenden Stoffes aber ist diese Änderung von c gleich groß, mag man die Menge des Fermentes oder des spaltbaren Substrates auch variieren.

Es wird also durch eine gegebene Menge des hemmenden Stoffes die Geschwindigkeit v auf eine kleinere Geschwindigkeit v_1 herabgedrückt. Wir nennen nun den Bruch

$$\frac{v - v_1}{v} = h$$

den Hemmungskoeffizienten. Dieser muß also bei gegebener Menge des hemmenden Körpers unabhängig von der Menge des Fermentes und vor allem auch von der Menge des spaltbaren Substrats sein.

Der zweite Fall der Hemmung beruht darauf, daß der hemmende Körper eine spezifische Affinität zum Ferment hat. Dann tritt eine Verteilung des Fermentes zwischen dem spaltbaren Substrat und dem hemmenden Körper ein; die Konzentration der intermediären Substrat-Fermentverbindung verringert sich, und damit zugleich ihre Zerfallsgeschwindigkeit. Die mathematische Entwicklung dieser Hemmung ist a. a. O.¹⁾ schon ausgeführt worden. Ihr Ergebnis ist:

$$\frac{k_1}{k} = \frac{[R]}{([S] + k) \left(\frac{v}{v_1} - 1 \right)} \dots \dots \dots (\Delta)$$

k_1 ist die Dissoziationskonstante der Verbindung des Fermentes mit dem hemmenden Stoff.

k ist die Dissoziationskonstante der Verbindung des Fermentes mit dem spaltbaren Substrat.

$[R]$ ist die Konzentration des hemmenden Stoffes.

$[S]$ ist die Konzentration des spaltbaren Substrats.

v ist die anfängliche Zerfallsgeschwindigkeit des Substrats bei Abwesenheit des hemmenden Körpers.

v_1 dieselbe bei Anwesenheit des hemmenden Körpers in der Konzentration $[R]$.

¹⁾ L. Michaelis und M. Menten, diese Zeitschr. 49, 338, 1913.

Führen wir den Begriff des Hemmkoeffizienten ein, so ist der in der Formel (A) vorkommende Ausdruck

$$\frac{v}{v_1} - 1 = \frac{h}{1 - h}$$

und

$$\frac{k_1}{k} = \frac{[R]}{([S] + k) \left(\frac{h}{1 - h} \right)}.$$

Um nun zu entscheiden, nach welchen der erwähnten beiden Mechanismen ein hemmender Stoff seine Hemmung ausübt, sind verschiedene Versuche auszuführen, in denen die Konzentration des Substrats und des hemmenden Stoffes variiert wird. Besonders entscheidend und unentbehrlich sind nach den obigen Erörterungen diejenigen Versuche, in denen bei konstanter Menge der hemmenden Stoffe nur die Menge des spaltbaren Substrats variiert wird.

Wir berechnen nun aus je einem Versuchspaar: a) Versuch ohne hemmenden Stoff, b) Versuch bei gleicher Substratkonzentration mit hemmendem Stoff, den Hemmkoeffizienten h . Beruht die Hemmung auf einer Änderung der Zerfallsgeschwindigkeitskonstante, so wird in allen Versuchspaaren auch bei verschiedenen Mengen des spaltbaren Substrats h konstant sein; beruht hingegen die Hemmung auf einer Affinität zum Ferment, so wird h nicht konstant sein, wohl aber die in Formel (A) dargestellte Funktion von h , die gleich $\frac{k_1}{k}$ ist. Sie ist das Verhältnis der Dissoziationskonstanten, und ihren reziproken Wert können wir als die (im Vergleich zum spaltbaren Substrat) „relative Affinität“ des hemmenden Körpers bezeichnen.

II.

Zur Prüfung, ob die oben dargelegten Annahmen und die sich logisch aus ihnen ergebenden Konsequenzen ausreichen, um einen Einblick in die Natur der verschiedenen Hemmungen zu gewinnen, wählten wir als Untersuchungsobjekt die Wirkung der Hefemaltase auf das α -Methylglucosid, über die wir die notwendigen Grundlagen in der vorigen Mitteilung¹⁾ gegeben haben.

¹⁾ Diese Zeitschr. 58, 148, 1913.

Alle Versuche beziehen sich auf die Wirkung eines Hefeauszuges auf α -Methylglucosid, die bei 38° und im Reaktionsoptimum stattfand. Das letztere wurde durch Zusatz einer bestimmten Menge von Natriumacetat hergestellt, gemäß den Ergebnissen unserer früheren Untersuchungen; dadurch wird ein $p_{\text{H}} = 6,6$ erreicht, der dem Reaktionsoptimum mit genügender Genauigkeit entspricht und fast unabhängig von der Individualität und Menge des angewendeten Hefeauszuges reproduzierbar ist. Dieses Gemisch wurde jedesmal erstens mit einer bestimmten Menge α -Methylglucosid, zweitens außerdem noch mit einer bestimmten Menge des auf seine hemmende Wirkung zu prüfenden Stoffes angesetzt. Nach einer gewissen Zeit wurden beiden Versuchen gleichzeitig Proben entnommen und die Menge der abgespaltenen Glucose bestimmt. Dies geschah im allgemeinen nach der Methode von Bertrand. Reduzierte der hemmende Stoff die Kupferlösung selber, so wurde der zu Anfang des Versuchs an einer Probe ermittelte Eigenreduktionswert des Gemisches festgestellt und später in Abzug gebracht. In dieser Differenzmethode liegt natürlich eine nicht unerhebliche Unschärfe der Resultate begründet, da wir immer nur kleine Umsätze verwerten können, solange nämlich die gebildete Glucosemenge eine geradlinige Funktion der Zeit ist. Die Variationsbreite der Versuche ist durch die häufig eintretende Unsicherheit einer jeden Differenzmethode in gewissen Grenzen eingeschränkt, doch genügt sie den Ansprüchen. Um diese Differenzmethode zu vermeiden, wurden einige Versuche, bei denen der hemmende Körper durch Glucose

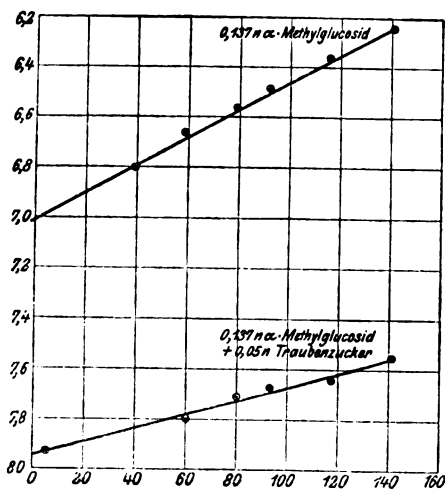


Fig. 1.

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinate: Drehungswinkel in einem
18,94 cm langen Rohr.

wurde der zu Anfang des Versuchs an einer Probe ermittelte Eigenreduktionswert des Gemisches festgestellt und später in Abzug gebracht. In dieser Differenzmethode liegt natürlich eine nicht unerhebliche Unschärfe der Resultate begründet, da wir immer nur kleine Umsätze verwerten können, solange nämlich die gebildete Glucosemenge eine geradlinige Funktion der Zeit ist. Die Variationsbreite der Versuche ist durch die häufig eintretende Unsicherheit einer jeden Differenzmethode in gewissen Grenzen eingeschränkt, doch genügt sie den Ansprüchen. Um diese Differenzmethode zu vermeiden, wurden einige Versuche, bei denen der hemmende Körper durch Glucose

repräsentiert wurde, auch polarimetrisch beobachtet, indem Proben von 10 ccm mit 1 ccm Normal-Sodalösung versetzt wurden, wodurch gleichzeitig die Fermentwirkung unterbrochen und die Multirotation der abgespaltenen Glucose beseitigt

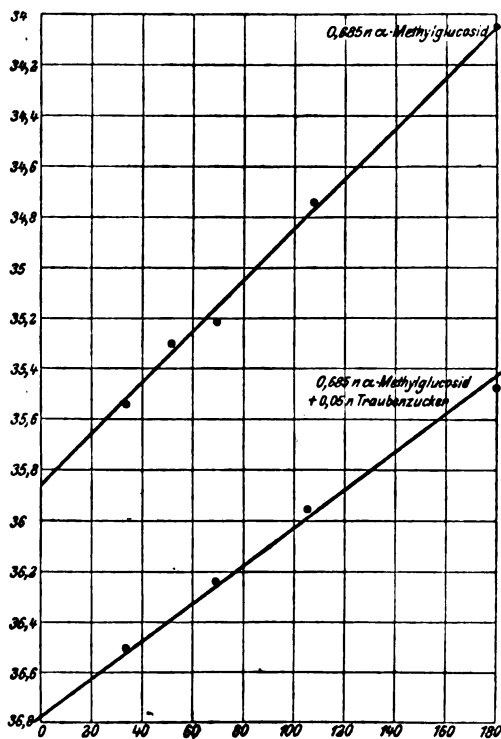


Fig. 2.

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinate: Drehungswinkel in einem 18,94 cm langen Rohr.

wurde. Zwei solche Versuche sind in der Fig. 1 und 2 wiedergegeben¹⁾.

Die folgenden Tabellen geben die durch die Reduktionsmethode erhaltenen Resultate.

¹⁾ $\frac{k}{k_1}$ (siehe unten) ist in diesen Versuchen gleich 0,19 bzw. 0,17.

Ver- such Nr.	α -Methyl- glucosid Kon- zentration	Zugesetzter Körper Konzentration	Gebild. Trau- benzucker in 20 ccm des Gemisches mg	λ	$\frac{k_1}{k}$
1	0,05 n 0,05 n	0 Traubenzucker 0,02 n	17,6 9,0	0,49	0,15
2	0,25 n 0,25 n	0 Traubenzucker 0,02 n	19,25 13,7	0,29	0,15
3	0,10 n 0,10 n	0 Traubenzucker 0,02 n	34,5 20,1	0,42	0,15
4	0,10 n 0,10 n	0 Traubenzucker 0,02 n	22,1 14,8	0,33	0,21
5	0,10 n 0,10 n	0 Traubenzucker 0,016 n	34,5 23,8	0,31	0,17
6	0,10 n 0,10 n	0 Traubenzucker 0,016 n	22,1 14,8	0,30	0,19
7	0,103 n 0,103 n	0 Traubenzucker 0,02 n	32,7 21,4	0,34	0,19
8	0,103 n 0,103 n	0 Traubenzucker 0,02 n	22,95 14,4	0,37	0,18
9	0,05 n 0,05 n	0 Traubenzucker 0,02 n	32,2 18,4	0,43	0,19
10	0,25 n 0,25 n	0 Traubenzucker 0,02 n	69,8 55,2	0,21	0,22
11	0,103 n 0,103 n	0 Traubenzucker 0,01 n	22,95 18,6	0,19	0,22
12	0,103 n 0,103 n	0 Traubenzucker 0,005 n	22,95 19,5		
13	0,05 n 0,05 n	0 Traubenzucker 0,05 n	12,0 5,0		
14	0,05 n 0,05 n	0 Traubenzucker 0,025 n	12,0 5,5		
15	0,05 n 0,05 n	0 Traubenzucker 0,1 n	11,0 ca. 2,0		
16	0,05 n 0,05 n	0 Traubenzucker 0,1 n	15,0 ca. 2,0		
17	0,05 n 0,05 n	0 Methylalkohol 1,375 n	21,5 5,9	0,72	3,8
18	0,25 n 0,25 n	0 Methylalkohol 1,375 n	49,4 18,3	0,33	2,4
19	0,05 n 0,05 n	0 Methylalkohol 0,2 n	20,7 18,5		
20	0,05 n 0,05 n	0 Methylalkohol 0,2 n	37,8 36,2		

Ver- such Nr.	α -Methyl- glucosid Kon- zentration	Zugesetzter Körper Konzentration	Gebild. Trau- benzucker in 20 ccm des Gemisches mg	λ	$\frac{k_1}{k}$
21	0,05 n	0	10,8		
	0,05 n	Äthylalkohol 0,2 n	9,0		
22	0,05 n	0	20,7		
	0,05 n	Äthylalkohol 0,2 n	16,8		
23	0,05 n	0	37,8		
	0,05 n	Äthylalkohol 0,2 n	32,6		
24	0,05 n	0	20,7		
	0,05 n	Aceton 0,2 n	16,5		
25	0,05 n	0	37,8		
	0,05 n	Aceton 0,2 n	30,5		
26	0,05 n	0	20,5	0,88	2,85
	0,05 n	Glycerin 0,2 n	12,7		
27	0,05 n	0	25,5	0,87	2,47
	0,05 n	Glycerin 0,2 n	16,0		
28	0,103 n	0	32,0	0,86	1,89
	0,103 n	Glycerin 0,2 n	20,5		
29	0,103 n	0	44,2	0,87	1,75
	0,103 n	Glycerin 0,2 n	27,8		
31	0,05 n	0	14,6	0,27	3,99
	0,05 n	Glycerin 0,1 n	12,25		
32	0,05 n	0	20,7	0,29	3,60
	0,05 n	Glycerin 0,2 n	14,8		
33	0,05 n	0	37,8	0,81	3,25
	0,05 n	Glycerin 0,2 n	26,3		
34	0,05 n	0	22,1		
	0,05 n	Urethan 0,1 n	17,9		
35	0,05 n	0	11,0		
	0,05 n	Galaktose 0,1 n	2,0		
36	0,05 n	0	11,0		
	0,05 n	Mannose 0,1 n	8,0		
37	0,05 n	0	15,0		
	0,05 n	Galaktose 0,1 n	5,0		
38	0,05 n	0	32,2	0,18	3,3
	0,05 n	Dimethylpyron 0,1 n	26,4		
39	0,25 n	0	69,9	0,20	1,8
	0,25 n	Dimethylpyron 0,1 n	55,9		
40	0,05 n	0	38,2		
	0,05 n	Na ₂ SO ₄ 0,2 n	35,0		

Ver- such Nr.	α -Methyl- glucosid Kon- zentration	Zugesetzter Körper Konzentration	Gebild. Trau- benzucker in 20 cem des Gemisches mg	h	$\frac{k_1}{k}$
41	0,05 n	0	38,2	0,49	1,42
	0,05 n	LiCl 0,2 n	19,4		
42	0,25 n	0	77,8	0,12	3,32
	0,25 n	NaCl 0,2 n	68,4		
43	0,25 n	0	77,8	0,20	2,4
	0,25 n	NaNO ₃ 0,2 n	62,4		
44	0,25 n	0	77,8		
	0,25 n	Na ₂ SO ₄ 0,2 n	73,3		
45	0,25 n	0	77,8	0,28	1,51
	0,25 n	LiCl 0,2 n	57,0		
46	0,25 n	0	38,5	0,35	1,10
	0,25 n	LiCl 0,2 n	25,0		
47	0,05 n	0	36,8	0,16	7,80
	0,05 n	NaCl 0,2 n	31,1		
48	0,25 n	0	80,5	0,15	3,44
	0,25 n	NaCl 0,2 n	68,8		
49	0,05 n	0	38,2	0,195	5,9
	0,05 n	NaCl 0,2 n	30,7		
50	0,05 n	0	38,2	0,23	4,65
	0,05 n	NaNO ₃ 0,2 n	29,2		
51	0,05 n	0	46,7	0,52	1,33
	0,05 n	LiCl 0,2 n	22,6		
52	0,25 n	0	99,0	0,28	1,50
	0,25 n	LiCl 0,2 n	70,8		
53	0,05 n	0	36,8	0,20	5,72
	0,05 n	NaNO ₃ 0,2 n	29,5		
54	0,25 n	0	80,5	0,20	2,42
	0,25 n	NaNO ₃ 0,2 n	64,8		
55	0,05 n	0	33,2		
	0,05 n	KCl 0,2 n	30,2		
56	0,05 n	0	33,2	0,53	1,42
	0,05 n	LiCl 0,2 n	15,5		
57	0,05 n	0	33,2		
	0,05 n	RbCl 0,2 n	28,5		
58	0,05 n	0	45,8	0,18	6,18
	0,05 n	NaCl 0,2 n	37,2		
59	0,05 n	0	45,8	0,29	3,47
	0,05 n	NaNO ₃ 0,2 n	32,6		
60	0,05 n	0	45,8		
	0,05 n	Na ₂ SO ₄ 0,2 n	39,1		

Ver- such Nr.	α -Methyl- glucosid Kon- zentration	Zugesetzter Körper Konzentration	Gebild. Trau- benzucker in 20 ccm des Gemisches mg	h	$\frac{k_1}{k}$
61	0,25 n	0	64,8	0,13	4,12
	0,25 n	NaCl 0,2 n	57,0		
62	0,25 n	0	64,8	0,23	1,93
	0,25 n	Na ₂ NO ₃ 0,2 n	49,7		
63	0,25 n	0	64,8	0,11	11,5
	0,25 n	Na ₂ SO ₄ 0,2 n	56,8		
64	0,05 n	0	37,4	0,11	11,5
	0,05 n	NaCl 0,1 n	36,0		
	0,05 n	NaCl 0,2 n	33,2		
65	0,05 n	0	37,4	0,19	5,90
	0,05 n	NaNO ₃ 0,1 n	33,2		
	0,05 n	NaNO ₃ 0,2 n	30,1		
66	0,05 n	0	37,4	0,19	5,90
	0,05 n	Na ₂ SO ₄ 0,1 n	36,1		
	0,05 n	Na ₂ SO ₄ 0,2 n	33,2		
67	0,05 n	0	22,6	0,25	4,3
	0,05 n	KCl 0,2 n	18,6		
68	0,05 n	0	22,6	0,25	4,3
	0,05 n	NaCl 0,2 n	16,2		
69	0,05 n	0	22,6	0,25	4,3
	0,05 n	NaBr 0,2 n	16,5		
70	0,05 n	0	38,6	0,25	4,3
	0,05 n	KCl 0,2 n	37,0		
71	0,05 n	0	38,6	0,25	4,3
	0,05 n	NaCl 0,2 n	32,6		
72	0,05 n	0	38,6	0,25	4,3
	0,05 n	NaNO ₃ 0,2 n	28,9		
73	0,05 n	0	21,5	0,25	4,3
	0,05 n	β -Methylglucosid 0,2 n	21,6		
	0	" 0,5 n	0		
74	0,05 n	0	39,1	0,25	4,3
	0,05 n	β -Methylglucosid 0,1 n	38,2		
	0,05 n	" 0,15 n	37,0		
75	0,05 n	0	24,2	0,25	4,3
	0,05 n	β -Methylglucosid 0,1 n	24,2		
76	0,05 n	0	44,7	0,25	4,3
	0,05 n	β -Methylglucosid 0,1 n	44,6		
	0	" 0,1 n	0		
77	0,05 n	0	12,7	0,25	4,3
	0,05 n	β -Methylglucosid 0,1 n	12,7		

Ver- such Nr.	α -Methyl- glucosid Kon- zentration	Zugesetzter Körper Konzentration	Gebild. Trau- benzucker in 20 ccm des Gemisches mg	λ	$\frac{k_1}{k}$
78	0,05 n	0	22,1		
	0,05 n	Dulcit 0,25 n	22,5		
79	0,05 n	0	20,7		
	0,05 n	Dulcit 0,1 n	20,6		
80	0,05 n	0	39,1		
	0,05 n	Mannit 0,1 n	39,0		
81	0,05 n	0	20,7		
	0,05 n	Mannit 0,1 n	20,8		
82	0,05 n	0	12,7		
	0,05 n	Mannit 0,1 n	12,8		
83	0,05 n	0	39,2		
	0,05 n	Glykokoll 0,1 n	39,5		
84	0,05 n	0	33,2		
	0,05 n	Harnstoff 0,1 n	33,2		
85	0,05 n	0	12,0		
	0,05 n	Harnstoff 0,2 n	12,0		
86	0,05 n	0	17,6		
	0,05 n	Lactose 0,05 n	17,6		
87	0,05 n	0	80,5		
	0,05 n	Lactose 0,05 n	80,5		
88	0,05 n	0	11,0		
	0,05 n	Lävulose 0,1 n	11,0		
89	0,05 n	0	15,0		
	0,05 n	Lävulose 0,1 n	15,0		

Nach vorstehenden Versuchen wurde die Spaltung des α -Methylglucosids durch die Maltase der Bierhefe gehemmt durch folgende Stoffe: Traubenzucker, Methylalkohol, Äthylalkohol, Aceton, Glycerin, Urethan, Mannose, Galaktose, Dimethylpyron, ferner durch die Neutralsalze, NaCl, KCl, LiCl, RbCl, NaNO₃, Na₂SO₄.

Hingegen wurde keine Hemmung beobachtet bei β -Methylglucosid, Dulcit, Mannit, Glykokoll, Harnstoff, Lactose, Lävulose.

Die Angabe von Armstrong¹⁾, nach der β -Methylglucosid die Wirkung der Maltase hemmt, konnten wir nicht bestätigen. Diese Differenz kann (außer dem Umstande, daß Armstrong mit einer höheren Konzentration an β -Methylglu-

¹⁾ H. E. und E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 79, 360, 1907.

cosid gearbeitet hat) darauf beruhen, daß Armstrong die Wirkung des Ferments auf Maltose, wie die auf α -Methylglucosid untersucht haben. Das maltosespaltende und das glucosidspaltende Ferment sind aber möglicherweise nicht identisch; es ist nicht auszuschließen, daß, während das erstere vom β -Glucosid gehemmt wird, letzteres vom β -Glucosid unbeeinflusst bliebe.

Die im ersten Teile dieser Arbeit entwickelten theoretischen Anschauungen wurden an Traubenzucker, Glycerin, ferner an den Neutralsalzen NaCl, NaNO₃ und LiCl geprüft. Dabei wurde folgenderweise verfahren.

Jeder Versuch besteht aus zwei Einzelversuchen. Z. B. Versuch 1 zeigt erstens die Wirkung des Fermentes auf α -Methylglucosid (0,05 n definitive Konzentration) allein, und zweitens nach Zusatz von 0,02 n (definitive Konzentration) Glucose. Nach einer gewissen, durch Vorversuche ausprobierten günstigen Zeit wird gleichzeitig aus beiden Versuchen eine Probe entnommen. Es finden sich z. B. in einem Versuch 17,6 mg Glucose, im zweiten nach Abzug der zugesetzten Glucose 9,0 mg entstandene Glucose. Da die gebildeten Glucosemengen gegenüber der überhaupt aus dem gegebenen Methylglucosid entstehungsfähigen Glucose klein sind, können wir die gebildeten Glucosemengen mit genügender Annäherung als ein Maß der gleichförmig gedachten Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse betrachten. Die Anfangsgeschwindigkeiten von Versuch a und b verhalten sich also

$$v : v_1 = 17,6 : 9,0,$$

und daraus berechnet sich

$$h = \frac{v - v_1}{v} = 0,488.$$

Andererseits berechnet sich die relative Affinität der Glucose

$$\frac{k_1}{k} = \frac{[R]}{[S + k] \cdot \frac{h}{1 - h}} = 0,15$$

wenn wir den Wert $k = 0,090^1)$ zugrunde legen.

¹⁾ P. Rona und S. Michaelis, diese Zeitschr. 58, 148, 1913. ^a

Wir machen nun derartige Versuchspaare mit wechselnden Mengen Glucosid und Glucose und berechnen jedesmal h und $\frac{k_1}{k}$. Wir finden, daß die Werte von h je nach den Umständen von 0,53 bis 0,19 schwanken, daß dagegen $\frac{k_1}{k}$ nur zwischen

0,15 und 0,22 schwankt und von dem Mittelwert 0,19 nicht mehr abweicht, als die Versuchsfehler es gestatten. Wir können daraus schließen, daß Glucose eine Affinität zum Ferment hat.

Die Dissoziationskonstanten $k_1 : k$ verhalten sich also wie 0,19 : 1, d. h. die Affinitätskonstante des Fermentes zur Glucose ist rund 5 mal größer als zum α -Methylglucosid. Wir haben hier den bemerkenswerten Fall, daß das Spaltprodukt eine viel größere Affinität zum Ferment hat als das spaltbare Substrat. Die Hemmung der Fermentwirkung durch die Glucose ist demnach eine ganz außerordentlich große (vgl. Versuch 15, 16).

Betrachten wir dagegen die hemmende Wirkung des NaCl, so finden wir sie erstens viel geringer. Zweitens finden wir, daß hier die Werte von h innerhalb der (nicht sehr kleinen) Versuchsfehler konstant sind, während die Werte $\frac{k_1}{k}$ selbst bei weitestem Spielraum der Versuchsfehler deutlich nicht als konstant zu betrachten sind, sondern einen Gang haben. Daraus schließen wir, daß NaCl keine Affinität zum Ferment hat, sondern daß es die Zerfallsgeschwindigkeit der Ferment-Glucosidverbindung herabsetzt. Der beobachtete Gang von $\frac{k_1}{k}$ ist in dem zu erwartenden Sinne. Ebenso liegen die Verhältnisse beim NaNO_3 .

Nur das LiCl macht eine Ausnahme. Es zeichnet sich erstens durch eine ganz besonders starke hemmende Wirkung aus, zweitens folgt dieselbe der Annahme einer Affinität des LiCl zum Ferment viel besser als der Annahme eines Einflusses auf die Geschwindigkeitskonstante. Nach Analogie mit den übrigen Neutralsalzen werden wir den letzteren Einfluß wohl auch annehmen dürfen, er wird aber durch den stärkeren Einfluß der Affinität des Li zum Ferment überdeckt. Die Annahme, daß gewisse Salze von einem Ferment wirklich gebunden werden können, findet ihre Bestätigung in einer Beobachtung von

Peirce¹⁾. Dieser fand, daß die Hemmung des NaF auf Lipase quantitativ derartig erfolgt, daß man ebenfalls eine Affinität dieses Salzes zum Ferment unter Bildung einer fermentativ unwirksamen Verbindung annehmen muß.

Es ist noch zu bemerken, daß Na stärker hemmt als K; das Chlorid und Nitrat hemmen stärker als das Sulfat.

Überblicken wir diese Resultate, so bemerken wir zunächst, daß nur wenige dieser Versuche einigermaßen geeignet sind, einwandfrei theoretisch verwertet zu werden. Denn wenn die Glucosebildung nach Zusatz des hemmenden Körpers nur um wenige Milligramm geringer ist als ohne denselben, so macht ein Analysenfehler von 1 mg schon die Verwertung illusorisch. Auch sonst ist die Reproduzierbarkeit der Versuche nicht immer die erwünschte. Immerhin erkennt man doch deutlich folgendes:

Stellen wir für eine gegebene Menge von Glucose die Werte von h und $\frac{k_1}{k}$ zusammen,

	h	$\frac{k_1}{k}$
Glucose 0,02 n, α -Methylglucosid 0,05 n	0,49	0,15
0,10	0,38	0,17
0,103		
0,103		
0,25		
0,25		
0,25	0,25	0,18
Glucose 0,05 n, α -Methylglucosid 0,685	0,28	0,17
0,137	0,53	0,19

so sieht man bei Glucose, daß die Werte von h einen Gang mit wechselnder Methylglucosidmenge haben, die Werte von $\frac{k_1}{k}$ dagegen praktisch wohl als konstant zu betrachten sind.

Dagegen zeigt sich z. B. beim Glycerin, daß h konstant ist und $\frac{k_1}{k}$ einen Gang hat.

	h	$\frac{k_1}{k}$
Glucosid 0,2 n, α -Methylglucosid 0,05 n	0,38	2,35
	0,37	
	0,29	
	0,31	
α -Methylglucosid 0,103 n	0,36	1,89
	0,37	
		1,75

¹⁾ G. Peirce, Journ. of Biolog. Chem. 16, 5, 1913.

Ebenso verhalten sich NaCl und NaNO₃ und Dimethylpyron:

	h	$\frac{k_1}{k}$	
NaCl 0,2 n, α -Methylglucosid 0,05 n	0,16	7,8	
	0,19		0,18
	0,18		
	α -Methylglucosid 0,25 n	0,12	3,3
		0,15	
0,13		4,1	
<hr/>			
NaNO ₃ 0,2 n, α -Methylglucosid 0,05 n	0,23	4,65	
	0,20		0,23
	0,29		
	α -Methylglucosid 0,25 n	0,19	5,90
		0,20	
0,23		1,93	
<hr/>			
Dimethylpyron 0,1 n, α -Methylglucosid	0,05 n	1,8	
	0,25 n	3,3	

Hingegen schließt sich LiCl der Glucose an:

	h	$\frac{k_1}{k}$
LiCl 0,2 n, α -Methylglucosid 0,05 n	0,49	1,42
	0,52	
	0,53	1,33
α -Methylglucosid 0,25 n	0,28	1,51
	0,35	
	0,28	1,10
		1,50

Zusammenfassung.

Viele Stoffe hemmen die Wirkung von Fermenten auf das spaltbare Substrat. Diese Hemmung kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Einige Stoffe verkleinern die Geschwindigkeitskonstante der fermentativen Spaltung. Andere Stoffe tun dies nicht, legen aber infolge chemischer Affinität zum Ferment einen Teil des Ferments in Beschlag. Es werden die mathematischen Entwicklungen gegeben, die die Kriterien für diese beiden Arten der Hemmung darstellen. Die Anwendung

derselben führt zu dem Ergebnis, daß die Hemmung der Spaltung des α -Methylglucosids durch Hefeextrakt

durch Verkleinerung der Zerfallsgeschwindigkeitskonstante bei NaCl, NaNO₃, Glycerin,

durch Affinität zum Ferment bei Glucose, LiCl

stattfindet.

Zu erwähnen ist, daß Fructose und β -Methylglucosid den Prozeß überhaupt nicht hemmen, also auch keine Affinität zu dem α -Methylglucosid spaltenden Ferment haben.

Bemerkenswert ist ferner, daß die Affinität der Glucose zu diesem Ferment 5 mal größer ist als die des α -Methylglucosids selbst.

Über die verschiedenartige Natur der Hemmungen der Invertasewirkung.

Von

L. Michaelis und H. Pechstein.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 16. Januar 1914.)

Mit 14 Figuren im Text.

In der voranstehenden Arbeit wurden zwei verschiedenartige Mechanismen unterschieden, durch die ein fremder Stoff die Wirkung eines Ferments auf ein spaltbares Substrat hemmen kann und an dem Beispiele des α -methylglucosidspaltenden Ferments experimentell belegt.

Wir wiederholen dasselbe in dieser Arbeit für die Invertase. Mit dieser hatten wir uns schon in einer früheren Arbeit beschäftigt, wo wir aber nur die Hemmung infolge chemischer Affinität des hemmenden Körpers zum Substrat in Betracht zogen. Die soeben dargelegten Erörterungen werden uns Gelegenheit bieten, unsere früheren Beobachtungen zu erweitern und außerdem nach einer gewissen Richtung zu verbessern.

Wir beginnen mit der schon von V. Henri beobachteten Hemmung durch die Spaltprodukte, und zwar mit der Fructose.

Um ein Kriterium dafür zu haben, ob die Fructose durch Affinität zur Invertase hemmt oder durch Herabsetzung der Zerfallsgeschwindigkeit der Saccharose-Invertase-Verbindung, werden wir eine Reihe von Versuchen anstellen, in denen die Konzentration des Ferments und der Fructose konstant gehalten, die Menge der Saccharose variiert wird. Unsere früheren

Versuche hatten zum größten Teil die weniger entscheidende Anordnung, daß die Saccharosemenge konstant gehalten und die Fructosemenge variiert wurde.

Die Versuche bestätigen unsere frühere Annahme¹⁾ von einer chemischen Affinität von Fructose zur Invertase, und auch die Größe dieser Affinität stimmt innerhalb der Fehlergrenzen mit den früheren Beobachtungen überein.

Anders dagegen steht die Sache beim Glycerin. Wir hatten in der früheren Arbeit seine hemmende Wirkung ebenfalls auf eine Affinität zum Ferment zurückgeführt; die Anwendung der soeben von uns abgeleiteten Kriterien ergibt aber, daß das nicht der Fall ist, denn der „Hemmungskoeffizient“ einer gegebenen Konzentration von Glycerin gegenüber variierten Mengen von Saccharose ist konstant, während die aus verschiedenen Versuchen berechnete Affinitätskonstante des Glycerins zum Ferment nicht zu einem konstanten Wert führt. Wir dürfen durch Analogie wohl schließen, daß die früher beobachtete geringe Hemmung des Mannits auf dieselbe Ursache zurückzuführen ist. Es herrscht demnach Übereinstimmung zwischen den Hemmungsmechanismen der höheren Alkohole auf das α -methylglucosidspaltende Ferment und auf die Invertase. Auch die geringe Hemmung des Äthylalkohols in höheren Konzentrationen, die wir früher gegenüber der Invertase beobachteten, ist zweifellos von derselben Natur und nicht auf eine chemische Affinität zu beziehen.

Besondere Aufmerksamkeit schenkten wir nun denjenigen Disacchariden bzw. Glucosiden, die von Invertase nicht gespalten werden: Maltose, Lactose, α - und β -Methylglucosid. Es handelt sich vor allem um die ganz prinzipielle, höchst-wichtige Frage, ob ein an sich hydrolysierbarer Körper von einem hydrolysierenden Ferment gebunden werden kann, ohne gespalten zu werden.

Wir können nun in der Tat zunächst von Lactose, Maltose, α - und β -Methylglucosid zeigen, daß sie von der Invertase nicht gebunden werden, ebensowenig wie sie gespalten werden. Von der Lactose zeigten wir schon früher, daß sie die Invertasewirkung auf Saccharose nicht hemmt; das gleiche

¹⁾ L. Michaelis und M. Menten, diese Zeitschr. 49, 333, 1913.

ergibt sich aus den folgenden Versuchen für die Maltose und zunächst für das β -Methylglucosid.

Besonders interessant verhält sich das α -Methylglucosid. Sein Verhalten machte uns an unserer Auffassung zunächst irre, weil es die Wirkung der Invertase auf Saccharose stark hemmt, aber selber nicht gespalten wird, obwohl es ein hydrolysierbarer Zucker ist. Als wir aber unsere Kriterien anwendeten, ob die Hemmung auf einer chemischen Affinität beruht, fanden wir, daß eine solche nicht besteht: es läßt sich aus den verschiedenen Versuchsreihen kein gemeinschaftlicher Wert einer „Affinitätskonstante“ des α -Methylglucosids zur Saccharose ermitteln.

Dagegen ist der Hemmkoeffizient für eine gegebene α -Methylglucosidmenge auch bei wechselnder Saccharosemenge konstant. Daraus folgt, daß das α -Methylglucosid keine Affinität zur Invertase hat, sondern noch den Typus des Glycerins hemmt.

Wir können somit für die Invertase den durch 4 Beispiele gestützten Satz aussprechen:

Ein hydrolysierbarer Zucker (Disaccharid, Glucosid), der von der Invertase nicht gespalten wird, wird auch von ihr nicht gebunden. Das bestätigt die Auffassung, daß die Bindung an das Ferment die notwendige Vorstufe der Spaltung ist und daß das bindende und spaltende Vermögen eines Ferments untrennbar miteinander verbunden sind. Das spaltende Vermögen kann sich nur nicht jedem bindungsfähigen Körper gegenüber äußern; es kann es nur dann, wenn der bindungsfähige Körper die Konfiguration eines spaltbaren, anhydrid- oder esterartigen Körpers hat.

Experimenteller Teil.

Mit Ausnahme der Maltose sind für die untersuchten Körper nicht die Protokolle, sondern die Kurven gegeben, in denen die Abszisse die Zeit, die Ordinate die Änderung des Drehungswinkels angibt. Die Versuche wurden bei konstanter Temperatur von 28° im Wasserbade angestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Körper sind bei den einzelnen Kurven angegeben. Als Ferment wurde aus Bierhefe gewonnene Invertase benutzt.

Die Reaktion wurde durch 5 ccm eines Essigsäure-Acetatgemisches im Verhältnis 1:1 (n_{10} -Acetat) auf 100 ccm Flüssigkeit festgelegt. Die Reaktion betrug also $2 \cdot 10^{-5}$. In bestimmten Zeitintervallen wurden je 10 ccm der Flüssigkeit entnommen und mit 2 ccm 2 n-Natriumcarbonat versetzt, um durch diese Alkalität den Prozeß und zugleich die Multirotation momentan aufzuheben, und darauf die Flüssigkeiten polarisiert. Nicht besonders angeführt sind Versuche, in denen die Invertase allein auf Maltose und auf α -Methylglucosid einwirkte. In beiden Fällen konnten wir innerhalb mehrerer Stunden (bei der Maltose wurde der Versuch auf 24 Stunden ausgedehnt) keinerlei Änderung des Drehungswinkels unter dem Einflusse des Ferments feststellen.

I. Fructose.

In den 3 Versuchen von Fig. 1 und 2 ist der Gehalt an Saccharose konstant zu 0,25 normal gehalten und die Menge der zugesetzten Fructose variiert. Das Verhältnis der Dissoziationskonstanten der Fructose-Invertase-Verbindung, kurz bezeichnet als die „Konstante der Fructose“, k_1 , zu der Konstante der Saccharose, k , ergibt sich aus diesen Kurven, nach der Formel $\frac{k_1}{k} = \frac{\text{Konz. d. Fructose}}{(\text{Konz. d. Sacch.} + k) \cdot \left(\frac{v_0}{v} - 1\right)}$ berechnet, zu 2,6, 3,1 und 3,6.

Die beiden Versuche von Fig. 3 und 4 sind Parallelversuche von 2 verschiedenen Tagen. Die Konzentration an Saccharose ist gegenüber den vorigen Versuchen auf 0,15 normal herabgesetzt. Das Verhältnis der Konstanten ergibt die Werte 2,4 und 3,2.

In den 5 Versuchen von Fig. 5 ist der Gehalt an Saccharose wieder herabgesetzt, und zwar auf 0,05 normal. Der Gehalt an Fructose ist variiert zwischen 0,2 und 0,025. Die Kurven III bis IV sind mit geringerem Fermentgehalte angesetzt als I und II. Der Wert des Zerfallskonstantenverhältnisses ist 3,0, 3,7 und 2,8. Als Durchschnittswert aller Versuche ergibt sich also für das Verhältnis der Zerfallskonstanten die Zahl 3,1. Um diesen Wert also schwanken die einzelnen Werte, gleichgültig, ob wir die Saccharose oder

die Fructosemenge variieren, nicht mehr, als die Versuchsfehler es gestatten; der Wert war von früher l. c. zu 3,45

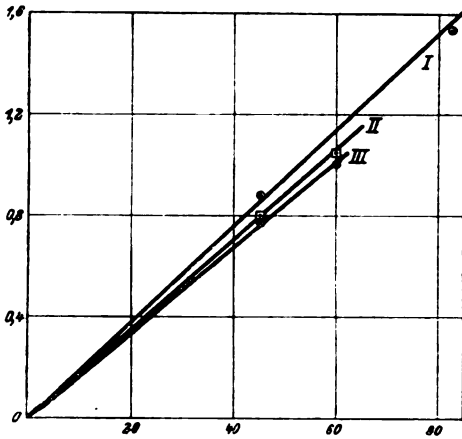


Fig. 1.

I Gehalt an Sacch. $0,25 n$
 II " " " $0,25 n + \text{Fruct. } 0,05 n$
 III " " " $0,25 n + \text{ " } 0,10 n$

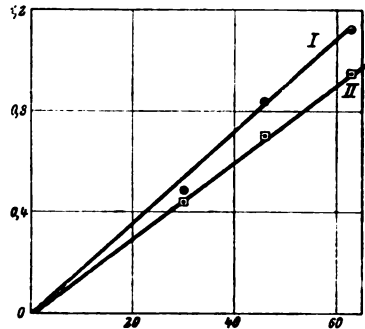


Fig. 2.

I Gehalt an Sacch. $0,25 n$
 II " " " $0,25 n + \text{Fruct. } 0,20 n$

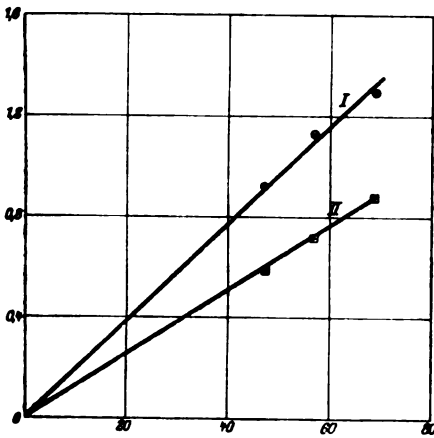


Fig. 3.

I Gehalt an Sacch. $0,15 n$
 II " " " $0,15 n + \text{Fruct. } 0,20 n$

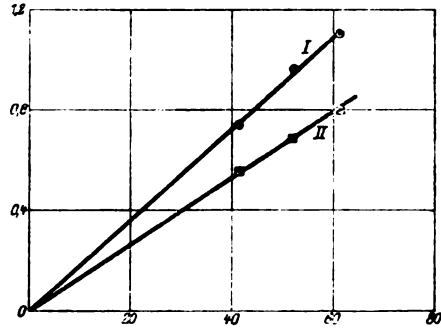


Fig. 4.

I Gehalt an Sacch. $0,15 n$
 II " " " $0,15 n + \text{Fruct. } 0,20 n$

bestimmt worden, ein Wert, der ebenfalls innerhalb der Versuchsfehler übereinstimmt.

Anders verhält sich die Hemmung durch das α -Methylglucosid in den folgenden Versuchen (Fig. 6 und 7).

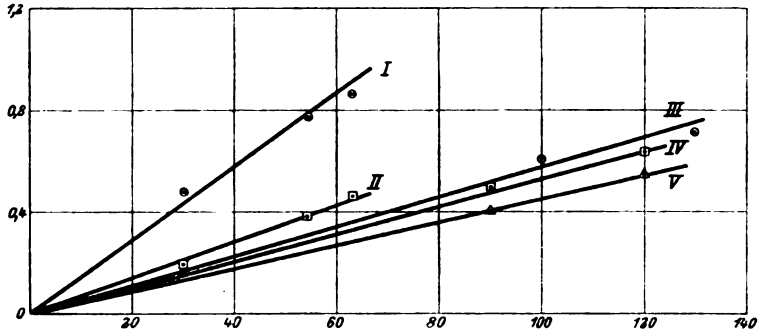


Fig. 5.

<i>I</i>	Gehalt an Saccharose	0,05 n
<i>II</i>	" " "	0,05 n + Fructose 0,2 n
<i>III</i>	" " "	0,05 n ohne Fructose (geringe Fermentmenge)
<i>IV</i>	" " "	0,05 n + Fructose 0,025 n
<i>V</i>	" " "	0,05 n + " 0,05 n

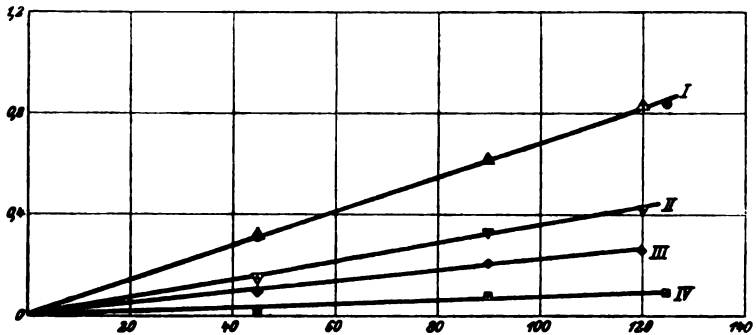


Fig. 6.

<i>I</i>	Gehalt an Saccharose	0,05 n
<i>II</i>	" " "	0,05 n + α -Methylglucosid 0,025 n
<i>III</i>	" " "	0,05 n + " 0,05 n
<i>IV</i>	" " "	0,05 n + " 0,20 n

In diesen Versuchen ist der Gehalt an Saccharose konstant zu 0,05 normal gehalten, der Gehalt an Glucosid ist zwischen 0,025 und 0,20 variiert. $\frac{k_1}{k} = 0,44, = 0,38$ und $= 0,41$ (Werte aus

Kurve VI) und $\frac{k_1}{k} = 0,42$ (Wert aus Kurve VII). In Kurve VII ist gegenüber VI die Menge des zugesetzten Fermentes erhöht. Halten wir also den Saccharosegehalt konstant, so folgt anscheinend die Hemmung durch das Glucosid den Gesetzen des Massenwirkungsgesetzes, indem die $\frac{k_1}{k}$ -Werte nur zwischen 0,38 und 0,44 schwanken; ganz andere Werte aber erhalten wir, wenn wir hier die Konzentration der Saccharose ändern, wie die folgenden Kurven zeigen (Fig. 8, 9, 10).

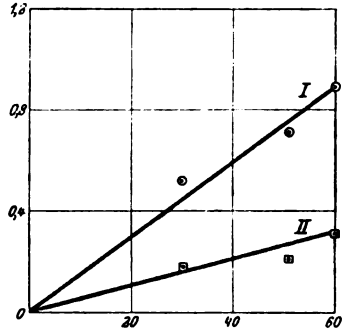


Fig. 7.

I Gehalt an Saccharose 0,05 n
 II " " " 0,05 n + α -Methylglucosid 0,05 n

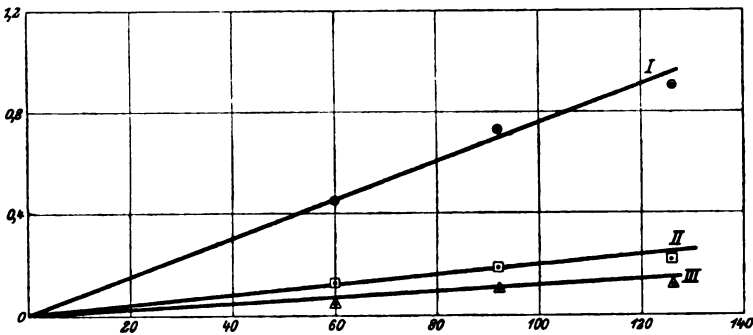


Fig. 8.

I Gehalt an Saccharose 0,25 n
 II " " " 0,25 n + α -Methylglucosid 0,05 n
 III " " " 0,25 n + " 0,10 n

In diesen Versuchen ist der Gehalt an Saccharose auf 0,25 erhöht. Der Fermentgehalt ist in Kurve IX ein anderer als bei VIII und X. Die Glucosidkonzentration ist zwischen 0,05 und 0,10 variiert. Als $\frac{k_1}{k}$ -Werte ergeben sich die Zahlen 0,07, 0,07, 0,09, 0,08 und 0,09. Auch diese Zahlen stimmen gut untereinander überein, doch ist ihr Durchschnittswert gänzlich verschieden von den Werten mit niederer Saccharose-

konzentration im Gegensatz zu den vorher angeführten Fructoseversuchen. Die Hemmung durch das Glucosid folgt also

nicht dem Massenwirkungsgesetze. Betrachten wir aber alle Versuche mit einem Glucosidgehalte von 0,05 normal, so ergeben sich als Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeit der Saccharose zur Zerfallsgeschwindigkeit der Saccharose + 0,05 α -Methylglucosid die Zahlen $\frac{75}{20}$, $\frac{75}{25}$, $\frac{75}{23}$ und $\frac{75}{24}$, d. h. durch einen Gehalt von 0,05 normal Glucosid wird die Zerfallsgeschwindigkeit der Saccharose unabhängig

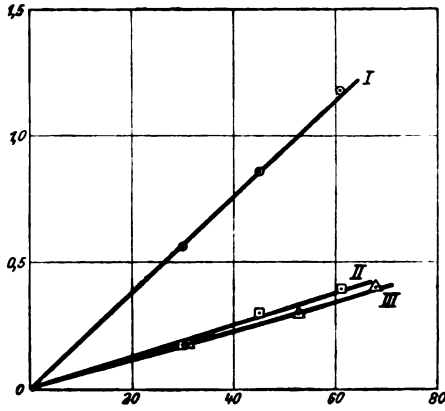


Fig. 9.

- I Gehalt an Saccharose 0,25 n
- II Gehalt an Saccharose 0,25 n
+ α -Methylglucosid 0,05 n
- III Gehalt an Saccharose 0,25 n
+ α -Methylglucosid 0,05 n

von der Konzentration dieser letzteren stets um denselben Bruchteil gehemmt.

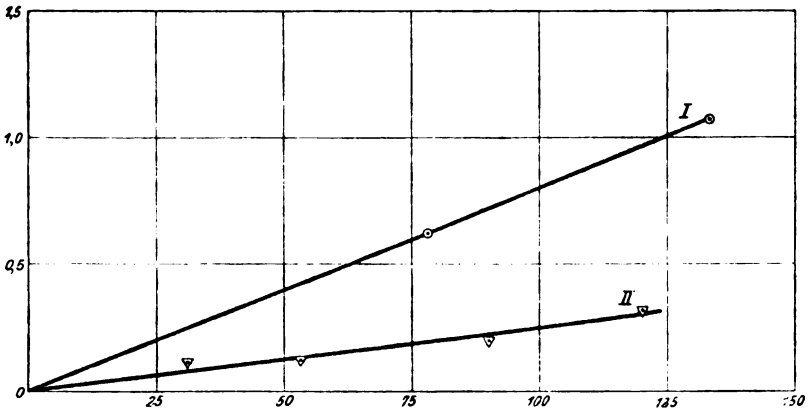


Fig. 10.

- I Gehalt an Saccharose 0,25 n
- II " " " 0,25 n + α -Methylglucosid 0,05 n

Den gleichen Befund können wir bei der Hemmung durch das Glycerin erheben (Fig. 11 und 12). Auch hier sind die $\frac{k_1}{k}$ -Werte bei veränderter Saccharosekonzentration gänzlich verschieden, andererseits ist das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeit der Saccharose (bei beliebiger Konzentration) zur Zerfalls-

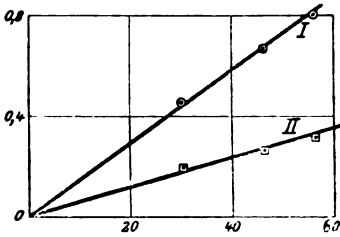


Fig. 11.

I Gehalt an Saccharose 0,05 n
 II " " " 0,05 n
 + Glycerin 0,10 n
 In der Abszisse ließ 60 statt
 80 Minuten.

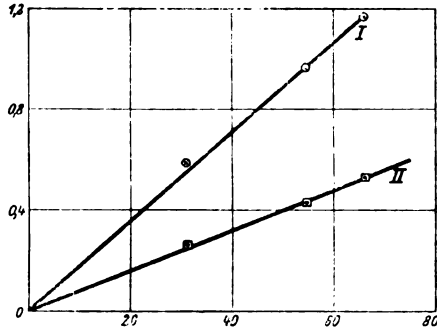


Fig. 12.

I Gehalt an Saccharose 0,20 n
 II " " " 0,20 n
 + Glycerin 0,10 n

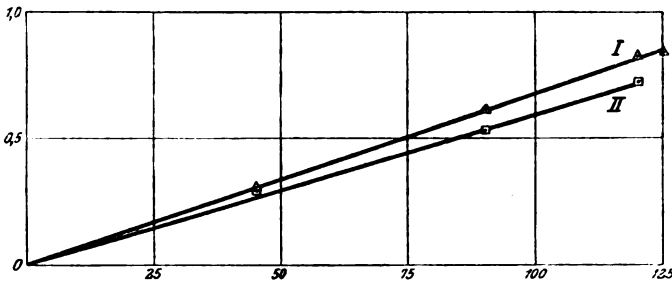


Fig. 13.

I Gehalt an Saccharose 0,05 n
 II " " " 0,05 n + β -Methylglucosid 0,05 n

geschwindigkeit der Saccharose + Glycerin (bei konstanter Konzentration) ein konstantes.

Der Gehalt an Glycerin ist in beiden Versuchen 1,0 normal. Der Gehalt an Saccharose im ersten Falle 0,05, im zweiten Falle 0,20 normal. Das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeiten ist $\frac{80}{32}$ und $\frac{80}{36}$. Würden wir die $\frac{k_1}{k}$ -Werte berechnen, so erhielten wir die Zahlen 10,0 und 3,9.

Noch anders liegen die Verhältnisse beim β -Methylglucosid (Fig. 13), das keine oder jedenfalls eine nur so geringe Hemmung ausübt, daß die erhaltenen Werte knapp außerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegen.

Ganz ebenso verhält sich die Maltose (Fig. 14). Auch hier ist die Hemmung, wenn überhaupt vorhanden, nur eine äußerst unbedeutende und vor allem in den einzelnen Versuchen jedesmal eine andere. Wir geben deshalb graphisch nur einen Versuch wieder, in dem sich überhaupt keine Hemmung durch die Maltose fand.

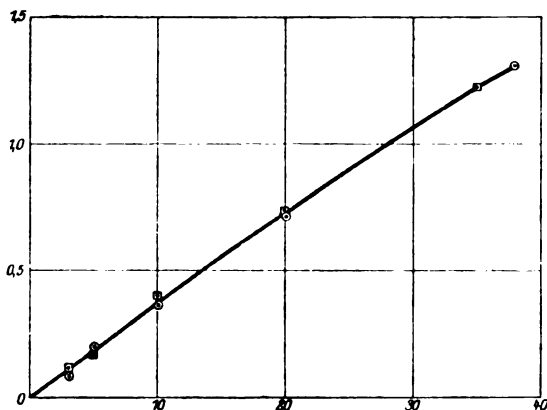


Fig. 14.

□ Gehalt an Saccharose 0,1 n
 ● " " " " 0,1 n + Maltose 0,1 n

Von den anderen Versuchen geben wir nur die Protokolle. Hätte keine Hemmung stattgefunden, so müßte bei den gleichen Entnahmezeiten die Differenz zwischen dem Ablesungswinkel der Saccharose + Maltoselösung und der Saccharoselösung stets die gleiche bleiben. Dies ist nicht vollkommen der Fall, vielmehr nimmt in den ersten 3 Versuchen die Differenz etwas zu. Die Werte sind jedoch äußerst gering $0,06^\circ$ (Sacch.: Malt. = 1:1), $0,10^\circ$ (Sacch.: Malt. = 1:4) und $0,18^\circ$ (Sacch.: Malt. = 1:4) bei einer Versuchsdauer von 40 bis 50 Minuten. Im Versuch 4 bleibt die Differenz innerhalb von 20 Minuten konstant (Sacch.: Malt. = 1:1) und in Versuch 5 nimmt die Differenz nur um $0,07^\circ$ zu, obwohl in dem Gemisch 4 mal mehr Maltose als Saccharose vorhanden und der Versuch sich über eine Zeit von 155 Minuten erstreckt.

I.

Saccharose 0,1, Maltose 0,1 normal.

Entnahmezeiten nach 15, 30 und 50 Minuten.

Drehungswinkel Sacch. + Malt.	10,68	10,32	9,87	9,21
" Sacch.	3,38	3,00	2,49	1,85
Differenz	7,30	7,32	7,38	7,36

II.

Saccharose 0,05, Maltose 0,20 normal.

Entnahmezeiten nach 5, 15, 29, 50 Minuten.

Drehungswinkel Sacch. + Malt.	16,34	16,09	15,54	15,08
" Sacch.	1,58	1,29	0,68	0,32
Differenz	14,76	14,80	14,85	14,86

III.

Saccharose 0,05, Maltose 0,20 normal.

Entnahmezeiten sofort und nach 5, 10, 15, 25, 40 Minuten.

Drehungsw. Sacch. + Malt.	16,64	16,53	16,45	16,27	16,01	15,69
" Sacch.	1,78	1,59	1,44	1,27	1,02	0,65
Differenz	14,86	14,94	15,01	15,00	14,99	15,04

IV.

Saccharose 0,1, Maltose 0,1 normal.

Entnahmezeiten sofort und nach 3, 5, 10, 20 Minuten.

Drehungsw. Sacch. + Malt.	10,85	10,73	10,68	10,46	10,12
" Sacch.	3,48	3,40	3,29	3,12	2,76
Differenz	7,37	7,33	7,39	7,34	7,36

V.

Saccharose 0,05, Maltose 0,2 normal.

Entnahmezeiten sofort und nach 46, 90, 120, 155 Minuten.

Drehungsw. Sacch. + Malt.	20,99	20,82	20,49	20,39	20,21
" Sacch.	1,81	1,61	1,30	1,12	0,96
Differenz	19,19	19,21	19,19	19,27	14,25

Wir dürfen daher die hemmende Wirkung der Maltose vernachlässigen, oder wenn wir auf die äußerst kleinen Ausschläge doch Rücksicht nehmen wollen, dürfen wir annehmen, daß dieselbe Art der Hemmung, wie sie das Glycerin deutlich zeigt, bei der Maltase in einer kaum sicher bemerkbaren Größe ebenfalls vorhanden ist.

Zusammenfassung.

Die früher theoretisch entwickelten zwei verschiedenen Mechanismen, durch die ein fremder Stoff die Wirkung eines Ferments auf sein spaltbares Substrat hemmen kann, finden sich bei der Invertase wieder.

Fructose hemmt die Invertasewirkung infolge chemischer Affinität zur Invertase.

Glycerin und α -Methylglucosid haben keine Affinität zur Invertase, sondern sie setzen die Zerfallsgeschwindigkeit der Saccharose-Invertase-Verbindung herab.

Maltose, Lactose, β -Methylglucosid haben ebenfalls keine Affinität zur Invertase; aber sie haben auch auf die Zerfallsgeschwindigkeit der Saccharose-Invertase-Verbindung keinen sicher erkennbaren Einfluß. Auch dieser Einfluß kann also von sterischen Konfigurationen abhängig sein (Unterschied von α - und β -Methylglucosid).

Ein wohl allgemeines Resultat ist: ein hydrolysierbarer Zucker (Disaccharid, Glucosid), der von Invertase nicht gespalten wird, hat auch keine chemische Affinität zur Invertase.

Die Bindung der Invertase an einen hydrolysierbaren Zucker ist daher als die notwendige, gleichzeitig aber auch hinreichende Bedingung für die Hydrolyse dieses Zuckers zu betrachten; Bindung und Wirkung sind vorläufig nicht zu trennen. Die Bindung der Invertase an einen nicht hydrolysierbaren Zucker (Fructose) kann nur auf indirektem Wege erkannt werden.

Zur Theorie der elektrolytischen Dissoziation der Fermente.

Von

L. Michaelis.

(Eingegangen am 25. Januar 1914.)

Die Behauptung, daß die Abhängigkeit der Wirkung der Fermente von der $[H^+]$ den Gang einer „Dissoziationskurve“ habe, ist schon an vielen Beispielen quantitativ bewiesen worden (Invertase, Trypsin, Erepsin, Lipase des Magens, des Pankreas, des Serums). In denjenigen Fällen, wo Abweichungen hiervon beobachtet wurden, sind die Ursachen hierfür erkannt worden (Katalase, Speicheldiastase, Maltase). Es darf daher für die untersuchten Fermente meine Annahme als bewiesen betrachtet werden, daß die Fermente Elektrolyte sind, und nur einem ihrer elektrolytischen Dissoziationsprodukte die spezifische Wirkung anhaftet (den unelektrischen Molekülen bei der Invertase, den Anionen beim Trypsin, Erepsin, der Lipase, der Maltase; den Kationen beim Pepsin).

Die Gleichung dieser Dissoziationskurve ist allgemein:

$$y = \frac{k}{k+x} \quad \text{oder} \quad y = \frac{1}{1+\frac{x}{k}} \quad (\text{Dissoziationsrestkurve})$$

bzw.

$$y = \frac{x}{k+x} \quad \text{oder} \quad y = \frac{1}{1+\frac{k}{x}} \quad (\text{Dissoziationskurve}).$$

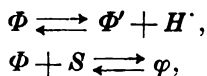
Die Konstante k können wir als den Parameter dieser Funktion bezeichnen. Ist y der Dissoziationsgrad bzw. Dissoziationsrest einer Säure, x die Wasserstoffionenkonzentration, so hat der Parameter die Bedeutung der Dissoziations-

konstante dieser Säure. Geometrisch hat, wie ich gezeigt habe, der Parameter folgende Bedeutung: er ist der Wert der Abszisse in demjenigen Punkte, wo die Ordinate gleich $\frac{1}{2}$ ist, wenn der maximale Wert der Ordinate gleich 1 gesetzt wird. Die Bedeutung des Parameters als Dissoziationskonstante ist unanfechtbar, sobald wir es wirklich mit einer Dissoziationskurve zu tun haben.

Die Kurven, die wir bei den Fermenten gewinnen, stellen aber in Wirklichkeit die Wirkungsgeschwindigkeit in ihrer Abhängigkeit von der $[H^+]$ dar. Unter der wohlbegründeten Annahme, daß unter sonst konstanter Beschaffenheit der Lösungsmittel diese Geschwindigkeit der jeweiligen Konzentration der intermediären Ferment-Substratverbindung proportional sei, stellen diese Kurven auch die Konzentration dieser intermediären Verbindung als Funktion der $[H^+]$ dar; nur hat die Ordinate dann einen relativen Wert, dessen absolute Größe unbekannt bleibt.

Ich trug nun früher kein Bedenken, dem Parameter auch dieser Kurven die gewohnte Bedeutung der elektrolytischen Dissoziationskonstante des Ferments zuzuschreiben¹⁾. Hierin steckt ein Fehler, den ich hiermit korrigieren will. Er wurde dadurch hervorgerufen, daß die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf diese Dinge von mir erst bei einer späteren Gelegenheit²⁾ konsequent durchgeführt wurde. Die Entwicklung hat nunmehr folgenden Gang.

1. Wir beginnen mit einem Ferment wie die Invertase, die nur in Form der unelektrischen Moleküle wirksam ist, und betrachten ihre Wirkung in demjenigen Gebiete von $[H^+]$, wo sie teilweise in Form von Anionen vorhanden ist (d. h. vom Wirkungsoptimum an nach der alkalischen Seite zu gerechnet). Wir haben also in Lösung: Saccharose, S , ferner H^+ , unelektr. Invertase, Φ , Invertaseanionen, Φ' . Am leichtesten ist es, zuerst die unelektrischen Invertasemoleküle Φ ins Auge zu fassen. Diese können zwei Reaktionen eingehen:



¹⁾ L. Michaelis und H. Davidssohn, diese Zeitschr. 35, 386, 1911.

²⁾ L. Michaelis und M. Menten, diese Zeitschr. 49, 333, 1913.

wo φ die Substrat-Fermentverbindung bedeutet. Folglich bestehen in der Lösung folgende zwei Gleichgewichte:

1. $k \cdot \Phi = \Phi' \cdot H$,
2. $a \cdot \Phi \cdot S = \varphi$.

Die Buchstaben sollen hier die Konzentrationen bedeuten. Die übliche Bezeichnungsweise C_Φ oder $[\Phi]$ soll der Übersichtlichkeit halber so vereinfacht werden, da ein Mißverständnis nicht möglich ist. Hier bedeutet k die elektrolytische Dissoziationskonstante des Ferments, als Säure aufgefaßt, und a die chemische Affinitätskonstante der Saccharose zu den an sie bindungsfähigen unelektrischen Fermentmolekülen. Nehmen wir noch die selbstverständliche Gleichung hinzu:

$$3. \quad \Psi = \Phi + \Phi' + \varphi,$$

wo Ψ die gesamte Konzentration des Ferments bedeutet, so können wir φ als Funktion von H darstellen, indem wir in 1. Φ und Φ' eliminieren. Es ergibt sich dann

$$\varphi = \Psi \cdot \frac{1}{1 + \frac{1}{a \cdot S} + \frac{1}{a \cdot S} \cdot \frac{k}{H}}$$

Hierfür können wir schreiben

$$\varphi = \Psi \cdot \frac{1}{1 + \frac{1}{a \cdot S}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{1}{1 + a \cdot S} \cdot \frac{k}{H}}$$

Bezeichnen wir $\frac{1}{1 + \frac{1}{a \cdot S}} = \rho$ und $\frac{1}{1 + a \cdot S} = 1 - \rho = \alpha$,

so ist

$$\frac{\varphi}{\Psi} = \rho \cdot \frac{1}{1 + \frac{\alpha \cdot k}{H}} \dots \dots \dots (1)$$

$\frac{\varphi}{\Psi}$ ist die Ordinate unserer „Fermentdissoziationskurven“. Sie ist, wie man sieht, proportional einer Funktion der Form

$\frac{1}{1 + \frac{q}{H}}$, sie stellt also eine „Dissoziationskurve“ dar, aber der

Parameter q hat hier nicht die Bedeutung der elektrolytischen Dissoziationskonstante der Fermente, sondern

$$q = \alpha \cdot k = \frac{k}{1 + \alpha \cdot S} \dots \dots \dots (2)$$

Aus dem graphisch bestimmbaren Parameter q finden wir also die wahre elektrolytische Dissoziationskonstante des Ferments k nach der Gleichung

$$k = q(1 + \alpha \cdot S) \dots \dots \dots (3)$$

Wenn wir also die Konzentration der Saccharose kennen (in der Versuchsreihe l. c. ¹⁾ ist $S = 0,1176$ n) und die von uns ermittelte Affinitätskonstante der Saccharose zur Invertase (nach l. c. ²⁾ gleich 60) benutzen, so finden wir aus dem von uns ermittelten Parameter ($2 \cdot 10^{-7}$) den wahren Wert von $k = 1,6 \cdot 10^{-6}$. Man sieht also, daß der Parameter q unserer experimentell gewonnenen Kurven von der Konzentration des spaltbaren Substrates, aber nicht von der Fermentmenge abhängig ist¹⁾. Das soll später experimentell nachgeprüft werden.

2. Wir entwickeln jetzt dasselbe für ein Ferment, dessen Anionen wirksam sind.

Die erste Gleichung bleibt bestehen:

$$1. \quad k \cdot \Phi = \Phi' \cdot H.$$

Die zweite Gleichung lautet aber dann:

$$2. \quad \alpha \cdot \Phi' \cdot S = \varphi,$$

und die dritte wieder:

$$3. \quad \Psi = \Phi + \Phi' + \varphi.$$

Durch Elimination von Φ' und Φ ergibt sich

$$\frac{\varphi}{\Psi} = \frac{1}{1 + \frac{1}{\alpha \cdot S} + \frac{1}{\alpha \cdot S} \cdot \frac{H}{k}}$$

¹⁾ Das gilt natürlich wie alles andere nur unter der Annahme, daß die molare Konzentration des Ferments sehr klein gegen die des Substrats ist.

$$\frac{\varphi}{\Psi} = \frac{1}{1 + \frac{1}{\alpha \cdot S}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{1}{1 + \alpha \cdot S} \cdot \frac{H}{k}}$$

$$\frac{\varphi}{\Psi} = e \cdot \frac{1}{1 + \alpha \cdot \frac{H}{k}}$$

Auch hier hat der Parameter q wieder die Bedeutung

$$q = \frac{k}{1 + \alpha \cdot S}$$

Es ändert sich also nichts an der Betrachtung; und das ist natürlich, weil die Dissoziationskurve und die Dissoziationsrestkurve spiegelbildsymmetrisch sind und einen gemeinsamen Parameter haben.

3. Sind die Kationen des Ferments wirksam (Pepsin), so lauten die drei Grundgleichungen:

1. $k \cdot \Phi = \Phi' \cdot OH'$,
2. $\alpha \cdot \Phi \cdot S = \varphi$,
3. $\Psi = \Phi + \Phi' + \varphi$.

Aus ihnen folgt in ähnlicher Weise:

$$\frac{\varphi}{\Psi} = e \cdot \frac{1}{1 + \alpha \cdot \frac{OH'}{k}}$$

Man braucht also nur die Hydroxylionenkonzentration an Stelle der $[H]$ zu setzen, und k bedeutet die Basendissoziationskonstante des Ferments.

Diese ganze Ableitung hat zur Voraussetzung, daß das spaltbare Substrat von den verschiedenen Modifikationen des Fermentmoleküls nur diejenige bindet, die auch die spezifische Wirkung trägt (d. h. also nur die unelektrischen Moleküle bzw. nur die Anionen bzw. nur die Kationen).

Zusammenfassung.

Stellt man die Wirksamkeit eines Ferments als Funktion der $[H]$ dar, so erhält man die Form einer Dissoziationskurve, wie wiederholt experimentell bewiesen wurde. Der Parameter

dieser Kurve, q , wurde von mir früher als elektrolytische Dissoziationskonstante des Ferments, k , gedeutet. Diese Auffassung muß dahin berichtigt werden, daß

$$q = \frac{k}{1 + a \cdot \bar{S}}$$

ist, wo S die Konzentration des spaltbaren Substrats, a die Affinitätskonstante des spaltbaren Substrats zu den wirksamen Fermentmolekülen (je nachdem: unelektrische Moleküle, Anionen oder Kationen des Ferments) bedeutet.

Über die Plasmolyse von Hefezellen.

Vorläufige Mitteilung.

Von

Hans Euler und Björn Palm.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule, Stockholm.)

(Eingegangen am 10. Januar 1914.)

Mit 2 Figuren im Text.

Durch eine Reihe von älteren Beobachtungen weiß man, daß Hefezellen unter Umständen sehr hohe osmotische Drucke vertragen können. So gab schon Laurent¹⁾ an, daß gewisse Hefearten sogar noch 60^o/_oige Zuckerlösungen vergären. Über das Verhalten der Hefe in hochkonzentrierten Zuckerlösungen hat später Bokorny²⁾ eingehendere Angaben gemacht. Besonders wies er darauf hin, daß die Inversionsfähigkeit der Hefe schon durch geringere Zuckerkonzentrationen gehemmt wird als die Gärkraft, und daß also in Traubenzuckerlösungen noch bei höheren Konzentrationen Gärung eintritt als in Rohrzuckerlösungen. Er fand, daß 58,8^o/_oige Lösungen von Traubenzucker noch kräftig vergoren werden, während in einer gleichkonzentrierten Rohrzuckerlösung die Kohlensäureentwicklung völlig ausblieb. Erst bei der Konzentration von 74^o/_o verhielten sich beide Zuckerarten gleich. Derselbe Forscher hat Versuche angestellt über die allmähliche Verminderung des Gärvermögens und die Grenze, bei der es ganz verschwindet.

Wir führen von seinen Versuchen die folgenden an:

1.	2.
Wasser . . . 30 g	Wasser 30 g
Rohrzucker . 20 g	Traubenzucker . 20 g
Preßhefe . . 10 g	Preßhefe 10 g

¹⁾ Annales de l'Inst. Pasteur 2, 603, 1888.

²⁾ Chem.-Zeitg. Nr. 90, 1903 und Allg. Brauer- u. Hopfen-Zeitg. 1903; zit. nach Centralbl. f. Bakt. (2), 12, 119, 1904.

Die Konzentration der Zuckerlösung betrug (unter Hinzurechnung des aus der Hefe austretenden Wassers) etwa 35,3⁰/₁₀. Es trat in beiden Fällen schon bald (nach wenigen Stunden) kräftige Gärung ein. Nach 5 Tagen zeigte der Versuch, daß in beiden Fällen noch Gärungsvermögen vorhanden war, denn beim Verdünnen mit Wasser unter Zusatz von etwas Dextrose wurde in beiden Flüssigkeiten kräftige Kohlensäureentwicklung beobachtet.

3.	4.
Wasser . . . 30 g	Wasser 30 g
Rohrzucker . 70 g	Traubenzucker . 70 g
Hefe . . . 10 g	Hefe 10 g

Die Zuckerkonzentration berechnet sich hier auf 65,7⁰/₁₀.

Nach einigen Stunden war bei Versuch 3 kaum eine Spur von Gärungserscheinungen wahrzunehmen; bei Versuch 4 etwas Gärungsgeruch, der nach 24 Stunden etwas deutlicher wurde. Jedenfalls war hier die Gärung in sehr starkem Maße behindert, wenn auch nicht vollständig unterdrückt, und zwar bei 3 mehr als bei 4. Bei 65,7⁰/₁₀igem Zuckergehalt wird also eine Rohrzucker- bzw. Traubenzuckerlösung kaum mehr oder nur äußerst langsam vergoren. Dabei ist das Gärungsvermögen der Hefe zunächst keineswegs als vernichtet anzusehen. Denn beim Verdünnen mit Wasser nach 1 tägiger ja sogar nach 5 tägiger Versuchsdauer tritt die Gärung ein.

5.	6.
Wasser . . . 30 g	Wasser 30 g
Rohrzucker . 50 g	Traubenzucker . 50 g
Hefe . . . 10 g	Hefe 10 g

Als die Versuche 5 und 6 während 14 Tagen stehen gelassen wurden, ergab der Wässerungsversuch, daß das Gärungsvermögen in beiden Fällen erloschen war, ebenso bei Versuch 3 und 4. An diese Versuche schließt Bokorny folgende Bemerkung: „Das Gärungsvermögen wird also durch konzentrierte Zuckerlösungen bei längerer Einwirkung dauernd vernichtet. Wie kommt die Zymase zu dieser Vernichtung ihres Fermentationsvermögens durch Zucker? Eine schädliche Wirkung der Spaltungsprodukte (Alkohol und Kohlensäure) ist bei Versuch 3 und 4 ausgeschlossen, weil es gar nicht zur Spaltung des

Traubenzuckermoleküles kommt. An eine Giftwirkung des Zuckers selbst ist wohl auch nicht zu denken, selbst bei hoher Konzentration nicht. Da bleibt also kaum etwas anderes übrig als anzunehmen, daß zum Bestande der Zymase etwas Wasser gehört, das ihr nicht genommen werden darf.“

Bei den von Bokorny gefundenen Grenzkonzentrationen für Traubenzucker waren die Lösungen etwa 3,7 normal, was einem osmotischen Druck von etwa 80 Atm. entspricht¹⁾.

Hohe Widerstandsfähigkeit gegen gelöste Salze hat z. B. Wehmer²⁾ beobachtet, nach dessen Angaben eine Hefe noch in einer Lösung wuchs, die 15% Chlornatrium enthielt; dies entspricht einer Normalität von 2,6 und einem osmotischen Druck von etwa 95 Atm.

Ausführlichere Versuche über das Verhalten der Hefe in konzentrierten Salzlösungen beschreibt Clerfeyt³⁾.

Drei Hefearten, eine englische Bierhefe vom Burton-Typus, eine belgische Brennereihefe und eine belgische Bierhefe (Docq) wurden in eine Nährlösung eingetragen (2% Rohrzucker und im übrigen die gewöhnlichen Salze enthaltend) und ferner in Lösungen, die außerdem Kaliumnitrat, Natriumnitrat, Kaliumchlorid, Natriumchlorid und Kaliumsulfat in solchen Mengen enthielten, daß ihr osmotischer Druck 1, 2, 4, 12, 20, 30, 40, 60 und 80 Atm. betrug.

Nach 3 Tagen fand sich in den Lösungen, deren osmotischer Druck 8, 12 und 20 Atm. war, ein beträchtlicher Bodensatz; geringer erschien er in den Flüssigkeiten vom Druck 4, 2 und 1 Atm. und in der Nährlösung sowie in der Lösung von 30 Atm.

Am 5. Tage war der Bodensatz in den Röhren mit 4, 2 und 1 Atm. und in der Nährlösung ebenso reichlich, wie in denjenigen vom osmotischen Druck 8, 12 und 20 Atm. Das Depot war ziemlich reichlich bei 30 Atm. und geringer bei 40.

Am 7. Tage waren die Depots von 30 und 40 Atm. viel deutlicher, das mit 60 Atm. ziemlich schwach.

Am 9. Tage entwickelte sich die Hefe in der Lösung von 80 Atm., aber der Bodensatz war sehr gering.

¹⁾ Unter normalen Verhältnissen vergären Hefezellen allerdings nicht so hoch konzentrierte Zuckerlösungen; bei der sogenannten Dickmaischung kommen in der Regel noch 25%ige Zuckerlösungen zur Anwendung.

²⁾ Wehmer, Centralbl. f. Bakt. (2), 3, 209, 1897.

³⁾ Clerfeyt, Acad. Roy. de Belg. 3, 337, 1901.

Die Ergebnisse von Clerfeyt zeigen, daß die konzentrierten Lösungen eine Wirkung auf Hefen ausüben, die von der chemischen Natur der Salze abhängig ist. Insbesondere scheint der basische Bestandteil die Hefe zu beeinflussen. Eine Gewöhnung der Hefen an Salzlösungen findet statt sowohl hinsichtlich des osmotischen Druckes im allgemeinen als auch hinsichtlich der einzelnen Salze.

Die höchst konzentrierten Lösungen waren die folgenden:

Salz	Konzentration %	Osmotischer Druck (angenähert)	Hefe
NaNO ₃	12,62	60	Burton
KNO ₃	20,39	80	"
KCl	10,52	60	"
KCl	14,13	80	"
NaCl	11,30	80	"
KCl	10,52	60	Docq
NaCl	11,30	80	"

Die genannte Untersuchung wurde bald darauf von Lepoutre¹⁾ fortgesetzt. Diejenigen Hefen, die in hochkonzentrierten Salzlösungen verweilt hatten, produzieren weniger Alkohol als diejenigen, die eine derartige Vorbehandlung nicht erfahren haben. Für ein und dieselbe Hefe, die an verschiedene Konzentrationen des gleichen Salzes angepaßt worden war, nimmt die Ausbeute an Alkohol mit der Konzentration des Mediums ab.

Zahlreiche Angaben liegen vor über die Alkoholtoleranz der Hefen. Von den verschiedenen Arten werden etwa 10 Vol-Prozente Alkohol eben noch vertragen. Nach Müller-Thurgau²⁾ existieren Stämme, die, in einen Nährboden gebracht, der 12 bis 12,5% Alkohol enthält, noch kräftige Vermehrung zeigen. Berechnet man aus den für Alkohollösungen vorliegenden Angaben einen Grenzwert des osmotischen Druckes, unter dem die Hefezellen eben noch existieren können, so findet man Werte von etwa 70 Atm. entsprechend einer Normalität von etwa 2,6.

¹⁾ Lepoutre, Acad. Roy. de Belg. 4, 155, 1902.

²⁾ 3. Jahresber. d. Versuchsstation f. Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil 1892. Zit. nach Lafar 4, 130, 1905.

Zu berücksichtigen ist bei der Beurteilung der vorliegenden Angaben vor allem, daß die Fähigkeit, in Lösungen von hohem osmotischen Druck zu leben nicht nur mit der Natur der Hefen variiert, sondern daß die einzelnen Zellen sich je nach ihrem Alter und nach ihrer Vorgeschichte den äußeren Umständen sehr verschiedener Art anpassen (vgl. auch Laurent, Ann. Soc. Belge de Microsc. 14, 1890 und bezüglich der Schimmelpilze die Arbeiten von Eschenhagen und von Errera, Bull. Acad. Sciences de Belgique 1899). Im übrigen sehe man die Zusammenstellung der Literatur bei Pantanelli (Jahrb. f. wiss. Bot. 40, 1904).

Über den osmotischen Grenzdruck der Hefen wußten wir bis vor kurzem noch gar nichts. Die ersten grundlegenden Arbeiten über den osmotischen Druck der Zellen überhaupt verdankt man bekanntlich de Vries¹⁾, Pfeffer, Hamburger²⁾ und Tammann³⁾, durch deren Untersuchungen festgestellt wurde, welche Salzlösungen mit Zellen — Hefezellen waren allerdings nicht zur Beobachtung gelangt — isotonisch sind.

Von einer Anzahl von Bakterienarten hat Wladimirow⁴⁾ gezeigt, daß ihr Zellsaft isosmotisch ist mit einer Kalisalpetrolösung von 0,6 g/Mol. per Liter.

Erst neuerdings haben H. Dixon und Atkins⁵⁾ Versuche angestellt, den im Inneren der Hefezellen herrschenden osmotischen Druck durch Messung der Gefrierpunktsdepression des ausgepreßten Saftes zu ermitteln. Aus ihrer Arbeit führen wir die folgende Tabelle an:

Flüssigkeit	Gefrierp.- Erniedr.	Osmotischer Druck in Atmosphären
Saft von gewaschener Bäckereihefe	1,064	12,80
" " gepreßter Bierhefe I . .	4,082	49,10
" " " " II . .	3,370	40,53
" " " " III . .	4,600	55,34
Würze I	1,177	14,16
" II	1,247	15,00

¹⁾ Pringsheims Jahrbücher 14, 427, 1884.

²⁾ Zeitschr. f. physikal. Chem. 6, 320, 1890.

³⁾ Zeitschr. f. physikal. Chem. 8, 688, 1891.

⁴⁾ Zeitschr. f. physikal. Chem. 7, 529, 1891.

⁵⁾ Scientif. Proc. Roy. Dublin Soc. 14, 9, 1913.

Aus den Versuchen der genannten englischen Forscher sehen wir also, daß die osmotischen Drucke im Inneren der Zellen stark variieren.

Die absoluten Druckwerte sind in den Hefezellen ganz erhebliche; immerhin sind dieselben aber noch bedeutend geringer als die osmotischen Drucke in den Lösungen, in denen Hefen sich noch entwickeln können.

Quantitative Versuche über den Grad der Anpassungsfähigkeit der Hefezellen an äußere osmotische Drucke liegen bis jetzt nur in sehr geringem Umfange vor, obwohl die Kenntnis des Verhaltens der Hefezellen von den wechselnden äußeren Konzentrationen für die Biologie der Hefe recht wesentlich ist.

Unsere Versuche, die zur Orientierung für eine eingehendere Untersuchung angestellt wurden, bezogen sich auf die Einwirkung von Mannit- und Glycerinlösungen auf untergärrige Bierhefe.

Methodik.

Was die Versuchsmethodik zur Bestimmung des osmotischen Druckes betrifft, so kann man auf zweierlei Weise verfahren. Entweder man bestimmt den Austritt oder Eintritt von Wasser bei den zu untersuchenden Zellen volumetrisch mit einem gewöhnlich als Hämatokrit bezeichneten Apparat¹⁾, für den zahlreiche Formen angegeben sind, oder mit einem Trichter-röhrchen nach Hamburger. Oder aber man bestimmt diejenige Konzentration, bei der Plasmolyse eintritt, d. h. bei der der Protoplast sich von der Zellwand abscheidet. In dieser Weise hat bekanntlich de Vries seine zahlreichen Druckmessungen angestellt²⁾. Für unsere Versuche, wo es auf eine Charakterisierung des Zustandes der Zellen ankam, war nur die letztere Methode verwendbar.

In den folgenden Versuchstabellen sind als „plasmolysiert“ diejenigen Zellen bezeichnet, in denen sich das Plasma vollständig von der Zellwand abgetrennt hatte.

¹⁾ Für Messung des Blutkörperchenvolumens zuerst von Hedin angegeben. Skand. Arch. f. Physiol. 2, 134, 1892.

²⁾ Jahrb. f. wiss. Bot. 14, 427, 1887.

Vorversuche.

I.

Ein Kolben mit Lindners Nährlösung wurde mit frischer Reinkulturhefe (Sankt Eriks Brauerei, Stockholm) versetzt. Nach 3 Stunden wurde die Nährlösung abgegossen und aus dem Bodensatz wurde eine Quantität Hefe genommen, die auf 3 Reagensröhren verteilt wurde, die eine 15⁰/₀ige Mannitlösung enthielten. Die genannten Proben wurden nun von Zeit zu Zeit mikroskopisch untersucht. Nach 16 Minuten, 30 Minuten und 1 Stunde zeigten sich keine Anzeichen von Plasmolyse. Nach 20 Stunden waren nur einzelne Zellen plasmolysiert oder tot. Die meisten zeigten, wie besondere Versuche ergaben, ein unverändertes Fortpflanzungsvermögen.

II.

Reinkulturhefe wurde in Glycerinlösungen von verschiedener Konzentration aufgeschlemmt. Die Lösungen enthielten 25⁰/₀, 20⁰/₀ und 15⁰/₀ Glycerin.

In 25- und 20⁰/₀iger Lösung trat Plasmolyse innerhalb 10 Minuten ein, in 15⁰/₀iger Lösung innerhalb 15 Minuten. Dabei wurde jedoch beobachtet, daß nur die ältesten Zellen plasmolysiert wurden.

III.

Dieser Vorversuch wurde wie die vorhergehenden ausgeführt, nur mit der Abänderung, daß die Zählung der Zellen sogleich nach der Einführung der Hefe in die Glycerinlösung geschah.

In 25⁰/₀iger Lösung wurden die alten Zellen beinahe augenblicklich plasmolysiert, und zwar in sehr großer Anzahl, nicht dagegen die jungen sprossenden Zellen. In 15⁰/₀iger Lösung wurden die Zellen etwas langsamer plasmolysiert und nicht in so starker Zahl. Die Beobachtungen wurden nach 3 Tagen wiederholt. Nur in den 15⁰/₀igen Lösungen war ein Zuwachs der Hefe bemerkbar.

Eine zur Kontrolle angestellte Versuchsserie IV hatte ein analoges Resultat wie die vorige.

Versuche.

1.

Um das Verhältnis zwischen den plasmolysierten und den nicht plasmolysierten Zellen in den verschiedenen Glycerin-

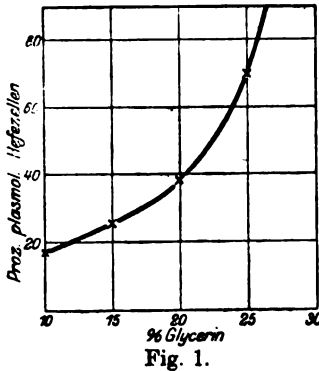


Fig. 1.

lösungen zu bestimmen, wurde folgende Rechnung angestellt, und zwar nachdem die Hefezellen 2 Stunden in der plasmolysierenden Flüssigkeit verweilt haben. Jedes Ergebnis wurde aus 10 Zählungen gewonnen. Aus den Summen der plasmolysierten Zellen und der nichtplasmolysierten Zellen wurde die prozentische Anzahl der ersteren berechnet. Die Lösungen waren

- I = 25⁰/₀ Glycerin
 II = 20⁰/₀ "
 III = 15⁰/₀ "
 IV = 10⁰/₀ "

I.

Plasmolysierte Zellen: 8, 7, 9, 7, 5, 12, 13, 4, 9, 4.
 Summe: 78 = 71⁰/₀.
 Nicht plasmolys. Zellen: 3, 2, 1, 3, 3, 7, 5, 2, 3, 3.
 Summe: 32.

II.

Plasmolysierte Zellen: 8, 6, 7, 8, 6, 4, 7, 4, 5, 6.
 Summe: 61 = 38,4⁰/₀.
 Nicht plasmolys. Zellen: 14, 6, 10, 4, 15, 10, 11, 6, 14, 8.
 Summe: 98.

III.

Plasmolysierte Zellen: 2, 6, 3, 3, 2, 3, 5, 2, 4, 5.
 Summe: 35 = 25,7⁰/₀.
 Nicht plasmolys. Zellen: 6, 20, 4, 11, 8, 7, 16, 6, 9, 14.
 Summe: 101.

IV.

Plasmolysierte Zellen: 2, 1, 2, 1, 4, 1, 2, 2, 3, 1.
 Summe: 19 = 17,1⁰/₀.
 Nicht plasmolys. Zellen: 8, 8, 12, 7, 23, 6, 7, 6, 10, 5.
 Summe: 92.

Die 25^o/_oige Glycerinlösung ist 2,77 normal und besitzt einen vom Glycerin herrührenden osmotischen Druck von etwa 70 Atmosphären.

Die Beziehung zwischen Glycerinkonzentration und Plasmolysegrad ist aus der Fig. 1 zu entnehmen.

2.

Wir geben nun einen Versuch an, der den Einfluß der Vorbehandlung auf die Plasmolyse bzw. die Entwicklung der Hefe in solchen Lösungen zeigt, in denen unter normalen Verhältnissen Plasmolyse eintritt.

Aus einer Emulsion von Reinkulturhefe wurde eine annähernd bestimmte Zellenzahl in eine Lindnersche Nährlösung übergeimpft, die 15^o/_o Glycerin enthielt. Die Entwicklung der Hefe in dieser Lösung wurde durch Zählung der Zellenzahl verfolgt. (Die erhaltenen Zahlen sind mit 4000 zu multiplizieren und geben dann die Anzahl der Zellen per Kubikmillimeter. Jedes Ergebnis ist aus 10 Zählungen erhalten, die wir hier bei diesem ersten Versuch anführen, um eine Vorstellung von der Größe der Versuchsfehler zu geben. Die Zählungen wurden unmittelbar nach der Einimpfung und dann nach 1, 2 und 4 Tagen vorgenommen.

Sogleich	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen
44	59	67
57	45	99
59	52	93
47	38	96
32	62	97
38	75	77
41	47	105
30	38	80
54	58	90
39	46	67
<hr/>		
Mittel 44,1	52,0	87,1

Aus einer in analoger Weise hergestellten Kultur wurde nach 1, 2 und 4 Tagen die annähernd gleiche Zellenzahl entnommen, wie bei obigem Versuch, so daß in diesen Kulturen die Zählung der Zellenzahl begonnen wurde, nachdem sich die Hefe während 1, 2 und 4 Tagen der 15^o/_oigen Glycerinlösung angepaßt hatte. Als Mittelwerte aus je 10 Zählungen wurden nunmehr die folgenden Zahlen gefunden:

Zellenzahl nach	Vorbehandlung in Lindners Nährlösung mit 15% Glycerin			
	0 Tag	1 Tag	2 Tage	4 Tage
Sogleich	44,0	40,3	48,6	58,1
1 Tag	52,0	57,7	71,2	109,5
2 Tagen	87,1	99,7	180,0	251,0
3 Tagen	—	199,0	—	—

Man sieht aus dieser Tabelle deutlich, wie sich die Hefe der Glycerinlösung, deren osmotischer Druck ursprünglich eine nicht unbeträchtliche Plasmolyse veranlaßt, allmählich anpaßt, so daß die Entwicklungsgeschwindigkeit bereits nach 1tägigem Verweilen in der 15%igen Glycerinlösung erheblich größer ist als ohne Vorbehandlung und mit der Dauer der Vorbehandlung ständig zunimmt.

Eine „Generationsdauer“ oder eine „Vermehrungskonstante“ kann aus diesen Zahlen nicht berechnet werden¹⁾, da sich ja der Einfluß der Anpassung noch während der Entwicklung geltend macht. Wählt man aber willkürlich das Zuwachsverhältnis für die Dauer von zwei Tagen, so ergeben sich folgende Zahlen:

Ohne Vorbehandlung	2,0
1 Tag " 	2,5
2 Tage " 	3,7
4 Tage " 	4,3

Die Deutung muß offenbar die sein, daß die mit der Glycerinlösung vorbehandelte Hefe relativ mehr junge Zellen enthält, die ihre ganze Entwicklung in der 15%igen Glycerinlösung durchgemacht haben. Diese Zellen unterliegen dann nicht mehr der Plasmolyse, wie junge Hefezellen (unter sonst

¹⁾ Euler und Palm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 63, 1912. Zu dieser Arbeit sei noch die Bestätigung eines daselbst angegebenen Versuches angeführt.

Es war früher von uns gefunden worden, daß sich unsere Hefe in einer Rohrzuckerlösung schneller vermehrt als in einer Traubenzuckerlösung von annähernd gleicher Konzentration.

Diesmal wurden je 10 ccm Hefeemulsion in 2 Kolben eingetragen, die 500 ccm Lindners Nährlösung und 5% Glucose (Versuch 1 und 2) bzw. 5% Rohrzucker (Versuch 3 und 4) enthielten. Nach 2 Tagen wurden

gleichen Umständen) überhaupt erst durch höhere Konzentrationen plasmolysiert werden als ältere. Besonders ist aber die Anpassungsfähigkeit der jungen Hefezellen viel größer als die der älteren¹⁾.

3.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß der zeitliche Verlauf der Plasmolyse einer Anzahl von Hefezellen dem zeitlichen Verlauf der Vergiftung nahekommt, falls nicht der ganze Vorgang durch sehr plötzlichen Konzentrationswechsel so schnell eintritt, daß eine Messung nicht vorgenommen werden kann.

Die Reinkulturhefe (untergärige Bierhefe), die in Lindners Nährlösung mit 5% Glycerin während etwa 12 Stunden aufbewahrt worden war, wurde in eine 25%ige Glycerinlösung übergeführt. Nach 1, 2 und 6 Stunden wurde die relative Anzahl der plasmolysierten und nichtplasmolysierten Zellen durch Zählung festgestellt. Wir erhielten folgende Werte:

diesem Kolben wieder 10 ccm Hefemulsion entnommen und in entsprechende frische Nährlösungen übergeimpft. Nach weiteren 2 Tagen geschah eine Überimpfung in derselben Weise.

Am 31. Oktober wurden den 4 Kolben Proben entnommen, in denen eine Zählung der Hefezellen vorgenommen wurde. Die relative Zellenzahl stellte sich wie folgt:

Glucose		Rohrzucker	
I	II	III	IV
158	171	211	213
158	122	168	128
125	132	172	146
156	189	138	163
149	116	235	143
132	193	187	182
138	192	229	142
129	117	226	188
138	112	185	212
111	152	200	191
<u>111</u>	<u>141</u>	<u>192</u>	<u>172</u>
139,4	148,8		

Die relative Entwicklung wird durch die Mittelwerte angegeben:

Glucose 144
Rohrzucker 182

Dies entspricht ganz unserem früheren Befund.

¹⁾ Vgl. hierzu die sehr gründliche Untersuchung von E. Pantanelli, *Jahrb. wiss. Bot.* 40, 303, 1904.

Dauer des Versuchs	Plasmol. Zellen	Nichtplasmol. Zellen	Plasmolysiert %
1 Std.	48	71	41
2 "	59	39	60
6 "	122	33	78

Der Verlauf der Plasmolyse ergibt sich aus nebenstehender Figur 2. Die Kurve deutet darauf hin, daß nicht alle Zellen gleichartig von der umgebenden Lösung beeinflusst werden.

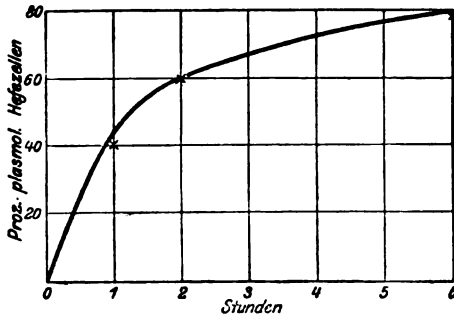


Fig. 2.

Wie durch Gifte scheinen die älteren Hefezellen durch hochkonzentrierte Stoffe verhältnismäßig stark angegriffen zu werden, während die jüngeren Zellen intakt bleiben.

Bei einer Erweiterung dieser Versuche ist zu untersuchen, inwieweit diese Kurve durch einen „Rückgang der Plasmolyse“ beeinflusst ist.

Diskussion.

Wir haben nun die Bedeutung der gefundenen Zahlen zu besprechen. Die Frage, auf die es hierbei wesentlich ankommt, ist die:

Was geht — chemisch oder physikalisch — vor, wenn sich die Zelle hohen osmotischen Drucken anpaßt?

Natürlich kommt die Permeabilität der Plasmahaut in erster Linie in Betracht. Man wird also die Ergebnisse der plasmolytischen Beobachtungen darnach zu beurteilen haben, ob der im äußeren Medium gelöste Stoff eindringt oder nicht.

Hierüber wissen wir bezüglich der Hefe eigentlich noch recht wenig. Anhaltspunkte liefert bekanntlich die Overtone-Theorie, aber zweifellos kommen außer der Lipoidlöslichkeit noch andere Faktoren zur Geltung. Fast die einzigen zuverlässigen Angaben über die Permeabilität der Hefezellen verdankt man Paine¹⁾, der kürzlich in Hardens Laboratorium in dieser Richtung Versuche angestellt hat.

¹⁾ Proc. Roy. Soc. B. 84, 289, 1912.

Über die Methodik dieses Forschers ist folgendes zu erwähnen.

Eine bekannte Menge gewaschener und gepreßter Bierhefe wurde in einem bestimmten Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeit suspendiert und in derselben etwa 20 Stunden in der Kälte aufbewahrt, nach welcher Zeit das osmotische Gleichgewicht zwischen Zelle und Lösung erreicht war. Die Suspension wurde zentrifugiert, bis der flüssige Anteil von suspendierten Hefezellen befreit war. Die klare Flüssigkeit wurde dann abgossen und der zurückbleibende Hefeteig abgepreßt. Es wurden folgende Bestimmungen gemacht, und zwar zu Anfang und zu Ende des Versuchs: Der gesamte Trockenrückstand einerseits der Flüssigkeit, andererseits der gepreßten Hefe, ferner die gelöste Substanz in der Flüssigkeit, und wenn möglich in der Hefe. Die quantitativen Versuche haben gezeigt, daß die Diffusionsfähigkeit des Äthylalkohols von derjenigen der organischen Salze durchaus verschieden war. Bei der Einführung der Hefe in verdünnten Alkohol, dessen Konzentration 5 bis 20% betrug, war das Verhältnis der Konzentration innerhalb der Zellen zu derjenigen außerhalb der Zellen praktisch konstant und unabhängig von der absoluten Konzentration. Alkohol diffundiert ganz leicht in die Zelle, aber das Verhältnis ist nicht gleich 1, sondern beträgt nur etwa 0,85. Alle untersuchten Salze wurden von der Hefe aus mäßig konzentrierten Lösungen aufgenommen, Natriumchlorid und Ammoniumsulfat auch aus verdünnten Lösungen. Während aber beim Alkohol die eingetretene Menge nach 3 Stunden dem Maximum der Aufnahmefähigkeit entsprach, war der Prozeß bei den Salzen sehr langsam. Natriumchlorid trat aus $\frac{1}{10}$ -Lösung in 3 Stunden ein. Nach 20 stündiger Einwirkung einer $\frac{1}{10}$ -Natriumphosphatlösung war der Eintritt von Phosphor in die Hefe nicht nachweisbar; erst bei Verwendung einer konzentrierten (0,3 molaren Lösung) war das Resultat deutlich positiv.

Leider ist der Bericht über die wertvollen Versuche von Paine nicht von Angaben über den plasmolytischen Zustand der Hefe begleitet.

Wir sind geneigt, nach unseren bisherigen Versuchen und früheren Angaben der Literatur anzunehmen, daß die Anpassung der Hefe an ungewöhnliche osmotische Drucke in erster Linie darin besteht, daß sich die Permeabilität

der Plasmahaut der Hefe ändert. Durch das Eindringen der die Hefe in höheren Konzentrationen umgebenden Stoffe, an die sich die Hefe „anpaßt“, wird die betreffende Differenz der osmotischen Drucke innerhalb und außerhalb der Zellmembran aufgehoben. Daß ein solches allmähliches Eindringen schwer permeabler Stoffe stattfindet, geht aus der Untersuchung Paines hervor.

Es muß ferner betont werden, daß auch Stoffe, für welche die Zellmembran unter normalen Verhältnissen impermeabel ist, unter geeigneten Bedingungen doch in das Zellinnere gelangen oder dasselbe verlassen können¹⁾; hierfür liefern besonders Salze und mehrwertige Alkohole gute Beispiele. Glycerin ruft in Konzentrationen, welche die Normalität übersteigen Plasmolyse hervor, dringt aber zweifellos allmählich in die Hefezelle ein.

Den Beziehungen beim Stoff- besonders Salzaustausch durch die Hefezellen ist besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Durch Versuche, die Herr Kand. Lundequist und Fr. Kand. Berggren vor einiger Zeit angestellt haben, ist nachgewiesen, daß die Hefe bei der Kultur in stark chlornatriumhaltigen Nährlösungen bedeutende Mengen Phosphorsäure verliert. Ein derartiger Austausch von Salzen entspricht den Befunden von Hamburger²⁾ und seiner Mitarbeiter an roten Blutkörperchen.

Die Nachprüfung der wertvollen osmotischen Versuche Hamburgers an roten Blutkörperchen, J. Loeb's, Höber's u. a. an anderen tierischen Zellen³⁾ dürften an Hefezellen, wo über die

¹⁾ Solche Änderungen der Permeabilität der Plasmahaut bei höheren Organismen sind den Pflanzenphysiologen wohl bekannt. „Es ist wohl zu beachten“, schreibt Pfeffer (Pflanzenphysiologie Bd. 1, S. 86), „daß die Plasmahaut ein lebendiges und vom Organismus abhängiges Organ ist, dessen sich der Protoplast zur Regelung des Verkehrs mit der Außenwelt bedient . . . Voraussichtlich werden transitorische oder bleibende Variationen der Plasmahaut häufig dazu benutzt, um die Aufnahme (oder Ausgabe) eines bestimmten Körpers zeitweilig einzuleiten oder zu unterdrücken.“ Eine Erhöhung der Permeabilität durch Salze hat Fluri nachgewiesen. Auch in Blutkörperchen und speziell in Hefen kommen solche Permeabilitätsbeeinflussungen vor (Lundberg, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 2, 223, 1913).

²⁾ Vgl. Hamburger und Bubanović, Kon. Akad. v. Wetenschapen, Amsterdam, 1910, S. 258.

³⁾ Vgl. Höber, Über den Mechanismus des Stoffwechsels bei den Zellen. Ergebnisse d. wissensch. Medizin. Leipzig 1910.

Chemie des Stoffwechsels relativ viel bekannt ist, für die Biologie der Hefe manches neue Ergebnis bringen.

Die Veränderungen der Saftkonzentrationen durch Polymerisationen, Depolymerisationen und andere chemische Veränderungen der normalen Inhaltstoffe der Zelle (van Rysselberghe) dürften bei der Hefe gewiß ebenfalls in Betracht kommen, aber, sofern nicht eine von Hamburger¹⁾ beobachtete ungleiche Permeabilität der Plasmahaut in der Hefe statthat, wohl erst in zweiter Linie.

Als dritte Phase bei der „Anpassung“ der Hefe hochkonzentrierter Lösungen wird man solche Veränderungen annehmen, die eine Fällung von Zelleiweiß verhindern. In dieser Hinsicht fehlen aber Anhaltspunkte noch fast vollständig.

Zusammenfassung.

1. Es wurde für eine untergärige Bierhefe die Abhängigkeit des Plasmolysegrades von der Konzentration von Glycerinlösungen für eine gewisse Plasmolyседauer festgestellt.

2. Eine „Anpassung“ der Hefe an Glycerinlösungen wurde quantitativ gemessen. Diese Anpassung der Hefezellen an ungewöhnliche osmotische Drucke ist vermutlich auf eine Veränderung der Permeabilität der Plasmahaut zurückzuführen.

3. Der zeitliche Verlauf der Plasmolyse von Hefe in 25%iger Glycerinlösung wurde gemessen; er folgt angenähert einer logarithmischen Kurve, was auf dem ungleichen Verhalten jüngerer und älterer Hefezellen gegenüber äußeren osmotischen Drucken beruhen dürfte.

4. Die von uns untersuchte Hefe entwickelt sich in Rohrzucker enthaltender Nährlösung rascher als in Gegenwart von Traubenzucker.

¹⁾ Diese Zeitschr. 11, 443, 1908.

Kritische Erörterung der Frage der tödlichen Minimaldosis und ihrer Beziehung zum Zeitfaktor.

Von

Georges Dreyer und E. W. Ainley Walker.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie und Bakteriologie der Universität Oxford.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1913.)

In einer früheren Arbeit¹⁾ ist festgestellt worden, daß zur Eichung von Toxinen und Antitoxinen nicht mehr Tiere von willkürlich gewähltem Gewicht, wie es bis jetzt geschehen ist, benutzt werden müssen, sondern daß innerhalb einer gegebenen Spezies Tiere von verschiedener Größe und ausgedehnter Gewichtsskala herangezogen werden können. Die einzige zu beachtende Vorbedingung ist die, daß die verabfolgte Dosis im Verhältnis zur Körperoberfläche und zum Blutvolumen des in Betracht kommenden Tieres berechnet wird. Zu diesem Zweck haben wir die Anwendung der Formel $D = \frac{d}{W^{0.72}}$ vorgeschlagen, in der D die Dosis im Verhältnis zur Tieroberfläche, W das Tiergewicht, d die wirkliche Menge der gegebenen Substanz ist. Mit Hilfe dieser Formel läßt sich ebenso leicht und bequem die „Oberflächendosis“²⁾ (D) für eine beliebige, wirklich verabreichte Droge (d) berechnen wie die Menge des Präparates (d), die gegeben werden muß, um eine Dosis (D) im Verhältnis zur Oberfläche des betreffenden Tieres zu erlangen. Doch spielt bei der mit Hilfe von Tierversuchen vorgenommenen Eichung von Toxinen, Antitoxinen und Arzneimitteln noch ein anderer, höchst wichtiger Faktor eine Rolle, nämlich die Zeit des töd-

¹⁾ G. Dreyer und E. W. Ainley Walker, Proc. Roy. Soc. B. Nr. 595, 87, 1913—1914.

²⁾ Die im Verhältnis zur Körperoberfläche (und zum Blutvolumen) berechnete Dosis.

lichen Verlaufes. Mit Rücksicht auf dieses Moment war es bis jetzt allgemein üblich, nicht nur Tiere von ad libitum gewähltem Gewicht zu benutzen, sondern auch eine Zeit, innerhalb welcher der Tod erfolgt, nach freiem Ermessen zu bestimmen, um derartige untereinander vergleichbare Resultate zu erhalten. Diese gegenwärtig einzige genaue Methode verdanken wir den bahnbrechenden Forschungen Ehrlichs. Sie bildet die Grundlage für das Studium der Probleme, die mit der Wirkung von Giften und den Schutzrichtungen des Organismus dagegen verknüpft sind. Wie weit jedoch diese Vergleichsmethode in Wirklichkeit davon entfernt ist, ein zuverlässiges Maß für die relative Toxizität abzugeben, wird aus den folgenden Betrachtungen hervorgehen, die unserer Meinung nach schon lange ein vertieftes Studium erheischt haben.

Nimmt man zwei Proben von Diphtherietoxin und bestimmt die Mengen jedes dieser Toxine, die ein Meerschweinchen vom Standardgewicht in der Einheitszeit töten und deshalb als äquivalente Dosen gelten könnten, so findet man, daß gleiche Vielfache oder Bruchteile dieser Mengen in ihrer Wirkung auf den Tierkörper nicht mehr gleichwertig sind. Folglich ist eine auf diese Weise bestimmte Äquivalenz nur eine rein zufällige und in keiner Hinsicht eine wirkliche. Wählt man andere Zeiten der tödlichen Wirkung, so werden die experimentell gefundenen äquivalenten Dosen in einem durchaus verschiedenen Verhältnis zueinander stehen.

Bei unserem Beispiel der zwei Proben Diphtherietoxine erhalten wir die folgenden Resultate für die äquivalenten Dosen in verschiedenen Zeiten.

Tabelle I.
Vergleich der Wirkungskraft von den Diphtherietoxinen B und C.

Tötet Meer- schwein- chen von 250 g in Stunden	Toxin B Dosis im Ver- hältnis zur Oberfläche $\times 10^7$ ccm	Toxin C Dosis im Ver- hältnis zur Oberfläche $\times 10^7$ ccm	Verhältnis zwischen äquiv. Dosen $\frac{\text{Dosis von B}}{\text{Dosis von C}}$
36	3519	3233	1,09
48	2860	2241	1,28
60	2632	1867	1,41
72	2522	1672	1,51
96	2413	1472	1,64
120	2359	1366	1,73
144	2327	1303	1,79

Man sieht sofort, daß das Verhältnis der äquivalenten Dosen der zwei Gifte beständig in dem Maße zunimmt, wie die Zeit bis zum Tode wächst. Werden für die Standardzeit mit tödlichem Ausgang 96 Stunden angenommen, so ist die gleichwertige Menge des Toxins B etwa 65% größer als die von Probe C. Fixiert man aber die Zeit auf 36 Stunden, so ist die äquivalente Dosis von Toxin B nur ungefähr 9% größer als die von Toxin C. Bei 6 Tagen, innerhalb deren Exitus erfolgt, ist die Dosis von Toxin B fast 80% stärker als die von Toxin C. Es steht uns aber noch ein anderer Weg offen. Wir können, anstatt zwei verschiedene Giftstoffe an einer bestimmten Tierart auszuprobieren, im Anschluß an die Beobachtungen von Wolfgang Ostwald und Dernoschek¹⁾ an der kleinen Crustacee Gammarus, die durch Eintauchen in Seewasser von wechselnder Konzentration vergiftet wurde, die Wirkung ein und derselben toxischen Substanz auf das männliche und weibliche Tier vergleichend untersuchen. Wir erhalten nach dieser Methode folgende Ergebnisse.

Tabelle II.

Aus Wo. Ostwalds Untersuchungen an Gammarus.

Konzentration von Seewasser ‰	Zeit bis zum Tode beim männl. Tier Min.	Zeit bis zum Tode beim weibl. Tier Min.	Verhältnis der Zeiten $\frac{\delta}{\text{♀}}$
58,7	36	36	1,00
47,2	48	46	1,04
40,1	79	53	1,49
35,4	120	77	1,56
33,0	147	86	1,71
28,3	328	185	1,76
25,9	lebt	328	∞

Aus Tabelle II geht somit hervor, daß für dieselbe Konzentration der giftigen Lösung das Verhältnis zwischen den einzelnen Zeiten mit letalem Verlauf für beide Geschlechter progressiv wächst, je schwächer die Konzentration des Toxins wird. So ist z. B. bei einer Konzentration von 58,7 die Zeit bis zum Tode bei beiden Geschlechtern die gleiche, während eine 40,1%ige Lösung fast 50% mehr Zeit zur Tötung des

¹⁾ Wo. Ostwald und A. Dernoschek, Zeitschr. f. Chem. u. Ind. d. Kolloide 6, 297, 1910.

männlichen als des weiblichen Tieres erfordert; bei einer Konzentration von 28,3 sogar über 75%.

Bestimmen wir also die Zeiten mit tödlicher Wirkung für eine Tierart und vergleichen dann die äquivalenten Dosen von zwei Toxinen, die in diesen Zeiträumen tödlich wirken, oder vergleichen wir bei verschiedenen Konzentrationen eines und desselben Giftes die Zeiten bis zum Tode bei weiblichen und männlichen Tieren derselben Spezies — in beiden Fällen kommen wir zu der Erkenntnis, daß die bis heute angewandte Standardmethode kein wahres Maß der relativen Giftigkeit darstellt.

Diese Folgerung ergibt sich notwendig aus der Tatsache, daß bei verschiedenen Zeiten bis zum Tode das Verhältnis zwischen den äquivalenten Dosen der Toxine schwankt. Ebenso inkonstant ist bei wechselnden Konzentrationen der toxischen Lösung das Verhältnis der Zeiträume der letalen Wirkung zueinander. Da diese Schwankungen scharf ausgeprägt sind, bedarf dieser Punkt, das leuchtet wohl ohne weiteres ein, keiner Erörterung mehr.

Es muß also eine andere Berechnungsart gefunden werden, die es erlaubt, die Toxizität ganz unabhängig von jeder willkürlich gewählten Zeit des tödlichen Verlaufes oder einer speziellen, zum Vergleich bestimmten Dosis zu ermitteln. Auf Grund eines sehr umfangreichen Materials ist es einem von uns (G. D.) nach langem Studium gelungen, die folgende Formel für die Beziehung zwischen Konzentration oder Menge der Dosis und der Zeit, die bis zum Eintritt des Todes oder irgendeiner anderen gewünschten Wirkung auf Tiere einer bestimmten Spezies erforderlich ist, aufzustellen. Sie lautet:

$$\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k(T_0 - T_1).$$

Darin sind D_0 und D_1 „Oberflächendosen“, d. h. proportional zur Körperoberfläche ausgedrückte Mengen, entsprechend den Zeiten T_0 und T_1 , in denen der Tod des Tieres (oder ein anderer beabsichtigter Effekt) erfolgt, α eine Zahl, deren Wert von der speziellen benutzten Tier- und Giftart abhängt, k eine Konstante, die für das jedesmalige Toxin und die angewandte Tierspezies zu bestimmen ist.

In Worten ausgedrückt, besagt die Formel einfach, daß jedem Zeitzuwachs eine bestimmte Abnahme in der Wirkung der Dosis entspricht ($D - a$).

Diese Gleichung haben wir an sehr umfangreichen Beobachtungsreihen von verschiedenstem Charakter angewandt und gefunden, daß wir in ihr eine äußerst befriedigende Berechnungsmethode haben. Wie weiter unten ausgeführt werden wird, läßt sich auch jeder einzelne Versuch in einer langen Serie mit gleicher Gültigkeit berechnen. Man ist weder an ein bestimmtes Gewicht noch an eine eigens gewählte Dosis und Zeit der tödlichen Wirkung gebunden.

Bevor wir in unserer Auseinandersetzung weitergehen, scheint es am Platze, die Größe a kurz zu erörtern. Bei der Bestimmung der minimalen letalen Dosis irgendeiner toxischen Substanz (oder derjenigen, die eine andere Wirkung ausübt) gelangt man schließlich, indem man die Dosierung allmählich verändert, zu einer Menge, die geringer als die kritische Dosis ist und wirkungslos erscheint. Das Tier stirbt nicht, oder wenn irgendeine andere Reaktion erwartet wird, so bleibt sie aus.

Wie nahe die Größe von a , wie sie durch unsere Methode bestimmt wird, der Größe der minimalen tödlichen oder andere Wirkungen erzeugenden Dosis kommt, hängt nicht nur vom Charakter der jeweiligen zu prüfenden Substanz ab, sondern auch vom Charakter des gewünschten Effekts — sei dieser nun Tod oder irgendein anderes Symptom toxischer Einwirkung. Auf die genaue Bedeutung von a kommen wir noch zurück.

Welche Tragweite für die Toxizitätslehre die Auffindung des Verhältnisses zwischen der Konzentration oder Menge der Dosis einerseits und der entsprechenden Zeit bis zum Tod andererseits haben würde, ist von mehreren Forschern auf diesem Gebiete schon lange eingesehen worden, namentlich von Arrhenius¹⁾, Warren²⁾, Wolfgang Ostwald³⁾ und Wolfgang Ostwald und Dernoschek (l. c.). In den Arbeiten

¹⁾ S. Arrhenius, Anwendung der physikalischen Chemie auf die Serumtherapie. Berlin 1904.

²⁾ E. Warren, Journ. of microscop. Science, New Series 45, 199, 1900.

³⁾ Wo. Ostwald, Arch. f. d. ges. Physiol. 120, 19, 1907.

von Warren, Ostwald, Ostwald und Dernoschek über kleine Crustaceen, die durch Immersion in verschiedene Salzlösungen getötet werden, finden wir auch Vorschläge für bestimmte Formeln.

Warrens Formel lautet: $\frac{1}{T} = k(c - n)$, in der T die Zeit bis zum Tode ist, c die Konzentration der Salzlösung, n eine von c immer gleiche abzuziehende Zahl, k eine Konstante. Diese Gleichung bedeutet, daß die Zeit mit tödlichem Verlauf der um n verminderten Konzentration indirekt proportional ist. Doch ist dies nicht der Fall.

Die von Ostwald und Dernoschek aufgestellte Formel heißt: $\frac{1}{T} = k(c - n)^m$. Sie ist augenscheinlich eine Verallgemeinerung der von den Autoren kritisierten Warrenschen Formel. Sie entsteht durch Einsetzen der wechselnden Größe m als Exponenten an Stelle von 1. Sie berechnen nun, anstatt mit Ostwalds ursprünglicher Formel $\frac{1}{T} = k \cdot c^m$, seine eigene Beobachtungen an Gammarus. Sie zeigen, wieviel befriedigender die Übereinstimmung zwischen erzielten und theoretisch berechneten Zahlen bei Gebrauch dieser Formel ist als bei derjenigen von Warren oder sogar der früheren von Ostwald. Die Größe n scheint Warren als die für das betreffende Tier (*Daphnia*) normale Salzkonzentration anzusehen, während Ostwald und Dernoschek ihren Wert durch Berechnung finden. Letztere Autoren legen aber anscheinend dem wahren Sinne von n in ihrer Formel keine rationelle Bedeutung bei.

Einer von uns (E. W. A. W.) beschäftigte sich im Jahre 1901¹⁾ mit dem noch unaufgeklärten Problem, in welchem Verhältnis die zur Neutralisierung einer tödlichen Minimaldosis im Körper eines Tieres nötige Menge von Antitoxin oder Antikörper zu derjenigen steht, welche die Wirkung vom Mehrfachen dieser Dosis aufhebt. Als Resultat seiner Untersuchungen konnte er zeigen, daß eine gewisse wirkungslose Dosis (α) immer von der nötigen Menge Antitoxin abgezogen werden muß. Da zurzeit aber dem Zeitfaktor keine Aufmerksamkeit geschenkt wurde, hatten die

¹⁾ E. W. Ainley Walker, Lancet 2, 1030, 1901 und Journ. of Hygiene 2, 85, 1902.

nach diesem System erlangten Versuchsergebnisse nur für eine beschränkte Reihe von Mehrfachen der tödlichen Minimaldosis Gültigkeit.

Nach der vom anderen von uns beiden (G. D.) ausgearbeiteten Formel hängt die Größe α von der Schnelligkeit des tödlichen Verlaufs ab, nicht nur von dem Umstand, daß der Tod eintritt oder nicht.

Wir wollen nun an der Hand von Beispielen zeigen, welchen praktischen Wert diese Formel nicht nur in ihrer Anwendung auf unsere eigenen experimentell gefundenen Resultate, sondern auch für eine große Anzahl bereits veröffentlichter Beobachtungen auf den verschiedensten Forschungsgebieten hat. In allen von uns geprüften Fällen, wo ein durch genügend umfangreiche und zahlreiche Einzelbeobachtungen zur Berechnung geeignetes Material vorlag, ist die Formel anwendbar und drückt die Versuchsergebnisse in äußerst befriedigender Weise aus.

In Tabelle III, IV und V sind drei Reihen eigener, mit Diphtherietoxin ausgeführter Versuche aufgeführt, in denen Toxin B in Wirklichkeit Toxin A war, das etwas später (ungefähr nach 3 Monaten) geprüft wurde, während die Versuche mit Toxin C alte, schon veröffentlichte sind¹⁾.

In allen Tabellen stehen die verabfolgten Mengen im Verhältnis zur Oberfläche nach der Formel $D = \frac{d}{W^{0,72}}$, in der W das Gewicht des Tieres in Gramm und d die wirklich eingegebene Dosis ist²⁾.

Die in Tabelle III verzeichneten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die von uns vorgeschlagene Formel die experimentellen Befunde für Versuchsgruppen in sehr glücklicher Weise veranschaulicht. Ogleich die benutzten Tiere einen Gewichtsumfang aufweisen, der sich zwischen 200 und 530 g bewegt, beträgt der Unterschied in den nach der Formel berechneten und den tatsächlich beobachteten Zeiten der tödlichen Wirkung im Durchschnitt nur 0,38%.

¹⁾ G. Dreyer, Experimentelle Untersuchungen über die Toxone des Diphtheriegiftes. Kopenhagen 1900.

²⁾ Dreyer und Ainley Walker l. c.

Tabelle III.

Diphtherietoxin B, Meerschweinchen subcutan injiziert.

(Eigene Versuche.)

$$\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k (T_0 - T_1). \quad k \times 10^7 = 665, \quad \alpha = 2200, \quad (T_0 = 36,3, \\ D_0 = 3555).$$

Nr.	Nr. des Versuchs	Tiergewicht	Wirkl. Dosis (d)	Dosis (D) im Verhältnis z. Oberfläche $D = \frac{D}{W^{0,72}} \times 10^7$	Stunden bis zum Tode	Dosis (D) im Verhältnis z. Oberfläche Tiergruppe	Stunden bis zum Tode. Tiergruppe = T beobachtet	Stunden bis zum Tode berechnet für Tiergruppe = T berechnet	Differenz in % zwischen berechnet. u. beobacht. Zeit	
1	19	440	0,01900	2370	30	2496	76,0	76,0	0,00	
2	20	355	0,01750	2552	118					
3	21	310	0,01600	2565	80					
4	22	200	0,01200	2640	100	2659	57,8	58,0	0,34	
5	24	470	0,02215	2640	38					
6	34	400	0,01990	2661	55					
7	39	330	0,01750	2696	38	2788	51,0	50,8	0,39	
8	43	230	0,01375	2745	64					
9	23	530	0,02560	2800	38					
10	27	435	0,02240	2820	51	2953	45,0	45,2	0,44	
11	42	255	0,01575	2920	40					
12	44	215	0,01400	2940	42					
13	26	460	0,02480	3000	53	3039	43,3	43,1	0,46	
14	29	430	0,02375	3015	44					
15	45	235	0,01535	3020	38					
16	33	400	0,02270	3040	44	3283	39,0	39,1	0,26	
17	37	360	0,02135	3080	47					
18	35	415	0,02480	3220	44					
19	25	425	0,02520	3230	49	3555	36,3	36,3	0,00	
20	30	435	0,02590	3258	32					
21	38	370	0,02415	3424	31					
22	32	415	0,02715	3525	49	3555	36,3	36,3	0,00	
23	28	425	0,02780	3560	30					
24	31	435	0,02845	3580	30					
							Durchschnitt	0,38		

Tabellen IV und V sind weitere Beweise für dieselbe Übereinstimmung. Aus diesen drei Tabellen ergibt sich auch, daß es bei der Beurteilung der drei Proben von Diphtherietoxin A, B und C unmöglich ist, auf Grund eines Vergleichs der in einer bestimmten Zeit zum Tode führenden erforderlichen Mengen irgendeine zuverlässige Schlußfolgerung zu ziehen. Denn, wie schon oben auseinandergesetzt, nehmen die Verhältnisse zueinander für jede Zeit andere Werte an. Dagegen erlangt

Tabelle IV.

Diphtherietoxin A, Meerschweinchen subcutan injiziert.

(Eigene Versuche.)

$$\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k (T_0 - T_1). \quad k \times 10^7 = 330, \quad \alpha = 1140, \quad (T_0 = 83, \\ D_0 = 1640).$$

Nr.	Nr. des Versuchs	Tiergewicht α	Wirkl. Dosis (d) ccm	Dosis (D) im Ver- hältnis z. Oberfläche $D = \frac{d}{W^{0,73}} \times 10^7$	Stunden bis zum Tode	Dosis (D) im Ver- hältnis z. Oberfläche Tiergruppe	Stunden bis zum Tode. Tiergruppe $= T$ beobachtet	Stunden bis zum Tode berechnet für Tiergruppe $= T$ berechnet	Differenz in % zwischen berechnet. und beobacht. T
1	16	587	0,0127	2165	220	1291	220	223	1,35
2	12	450	0,0107	2380	84	1359	160	161	0,62
3	13	295	0,0080	2710	170				
4	9	280	0,0078	2790	192				
5	17	592	0,0143	2415	192	1640	85	83	2,41
6	18	642	0,0170	2650	125				
7	15	317	0,0106	3345	45				
							Durchschnitt		1,46

man ein Maß von relativer Stärke, wenn man die Größen der drei verschiedenen Konstanten k , die von der Größe der wirksamen Toxinmengen abhängig sind, vergleicht. Diese Konstanten variieren in dem Sinne, daß in toxischen Substanzen derselben Art das schwächere Toxin ein größeres k in der Formel aufweist, während beim stärkeren der Wert für k abnimmt. Dieser Vergleichsmodus ist der einzige, der nicht nur vom Gewicht des Tieres (einer gegebenen Spezies) und von der Dosierung, sondern auch vom Zeitfaktor unabhängig ist. Er drückt die relative Stärke der drei Toxinproben aus. Sie verhalten sich zueinander wie $k_A : k_B : k_C$. Zusammenfassend können wir sagen, daß beim Vergleich von zwei Giftproben, z. B. zwei Diphtherietoxinen P und Q , in denen der Wert k für P doppelt so groß ist wie der für Q , für jeden gegebenen Zeitzuwachs in der Reziprozität der wirksamen Dosis im Falle von P das Doppelte des Zuwachses in der Reziprozität der wirksamen Dosis von Q ist.

Die wirksame Dosis ist in jedem Falle durch die Größe ($D - \alpha$) bestimmt.

Tabelle V.

Diphtherietoxin C, Meerschweinchen suboutan injiziert.

(Versuche von Dreyer.)

$$\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k(T_0 - T_1). \quad k \times 10^7 = 316, \quad \alpha = 1045, \quad (T_0 = 89, \\ D_0 = 1514).$$

Nr.	Nr. des Versuchs	Tiergewicht	Wirkl. Dosis (d)	Dosis (D) im Verhältnis z. Oberfläche $D = \frac{D}{W^{0,75}} \times 10^7$	Stunden bis zum Tode	Dosis (D) im Verhältnis z. Oberfläche Tiergruppe	Stunden bis zum Tode. Tiergruppe = T beobachtet	Stunden bis zum Tode berechnet für Tiergruppe = T berechnet	Differenz in % zwischen berechnet. und beobacht. T
1	8	250	0,0060	1123	180	1268	148	160	7,50
2	7	250	0,0070	1311	180				
3	17	265	0,0076	1371	84				
4	18	260	0,0076	1391	60				
5	12	250	0,0075	1404	132	1415	107	107	0,00
6	13	250	0,0075	1404	180				
7	11	250	0,0075	1404	96				
8	3	270	0,0080	1427	65				
9	15	250	0,0078	1461	108	1514	89	89	0,00
10	14	250	0,0078	1461	72				
11	16	250	0,0078	1461	72				
12	6	260	0,0080	1466	180				
13	10	250	0,0080	1498	62	1739	67	67	0,00
14	9	250	0,0085	1591	84				
15	2	270	0,0090	1604	65				
16	5	250	0,0090	1686	64				
17	1	270	0,0100	1781	72	1739	67	67	0,00
18	4	270	0,0100	1781	64				
Durchschnitt									1,88

Um auf die Bedeutung von α in der Formel zurückzukommen, so stellt sie die „unwirksame“ Fraktion der Dosis dar, d. h. diejenige Dosis, die allein nicht ausreicht, um Tod oder einen anderen verfolgten Zweck zu bewirken. Folglich ändert sich ihre Größe mit der Widerstandskraft des Geschlechtes und der Spezies des Versuchsobjektes. Sie ist höher bei dem giftfesteren und kräftigeren Typus und niedriger bei dem mehr empfindlicheren. Bei ein und derselben Giftsubstanz ist α größer, je kleiner die Toxizität der bestimmten angewandten Probe ist. So wurde bei den drei schon genannten Proben von Diphtheriegiften gefunden, daß für Probe C, die wirksamste, α einen Wert von 1045 hatte, für die etwas weniger aktive Probe A 1140 und für die bei weiten schwächste Probe 2200.

Tabelle VI.

Synthetisches Adrenalin, Mäusen subcutan injiziert.

(Versuche von Schultz.)

$$\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k(T_0 - T_1). \quad k \times 10^3 = 48, \quad \alpha = 900, \quad (T_0 = 30,7, \\ D_0 = 1677).$$

Nr.	Nr. des Versuchs	Tiergewicht	Wirkl. Dosis (d)	Dosis (D) im Verhältnis z. Oberfläche $D = \frac{d}{W^{0,75}} \times 10^3$	Minuten bis zum Tode	Dosis (D) im Verhältnis z. Oberfläche Tiergruppe	Minuten bis zum Tode Tiergruppe = T beobachtet	Minuten bis zum Tode berechnet für Tiergruppe = T berechnet	Differenz in % zwischen berechnet. und beobacht. T
1	215	19,05	13,53	1622	35	1677	30,7	30,7	0,00
2	271	19,47	13,84	1632	92				
3	277	19,80	14,07	1641	11				
4	268	22,58	16,03	1699	10				
5	255	23,65	16,79	1717	32				
6	265	25,00	17,75	1749	4				
7	176	14,37	12,26	1800	17	1886	25,0	25,0	0,00
8	259	14,71	12,50	1803	14				
9	253	18,05	15,34	1919	41				
10	256	19,17	16,29	1940	33				
11	245	20,05	17,04	1970	20	2051	22,0	22,0	0,00
12	173	12,57	12,38	2002	24				
13	248	22,60	19,21	2035	23				
14	174	13,20	13,12	2045	22				
15	177	13,76	13,68	2075	23				
16	171	14,50	14,41	2100	18	2357	18,8	18,2	3,30
17	249	18,31	18,12	2235	19				
18	178	13,42	14,78	2278	27				
19	243	20,64	20,52	2320	7				
20	246	22,59	22,33	2360	12				
21	244	15,22	17,20	2420	38				
22	247	17,78	20,11	2530	10	2634	14,3	15,9	10,10
23	175	17,00	19,53	2538	19				
24	172	20,93	23,80	2663	11				
25	250	22,37	25,31	2700	13				
							Durchschnitt	2,68	

In Tabelle VI werden die Versuche von W. H. Schultz¹⁾ mit einem synthetischen Adrenalin (Äthyl-amino-aceto-Brenz-catechin) an Mäusen einer Prüfung unterzogen. Wir entnehmen seinen Versuchsreihen (Tabelle XIV) 25, ungefähr zur gleichen Zeit angeführte Untersuchungen vom 5. und 16. Januar 1909) an Tieren, die früher mit diesem Präparat nicht behandelt worden

¹⁾ W. H. Schultz, U. S. Treasury Department Hygienic Laboratory Bull. Nr. 55. Washington 1909.

waren. Sie sind gemäß der „Oberflächendosen“ geordnet und in 5 Gruppen mit gemittelten „Oberflächendosen“ und den zur Tötung notwendigen Zeiten mit letalem Ausgang geteilt. Aus diesen Daten ist die Konstante k berechnet und damit die theoretische Zeitdauer bis zum Tode für jede Gruppe ermittelt. Die Differenz zwischen der berechneten und der praktisch gefundenen Zeit bis zum Tode beträgt im Durchschnitt nur 2,68%. Die oben vorgeschlagene Formel paßt also auch in Anbetracht dieser Ergebnisse sehr zweckmäßig für Versuche mit synthetischem Adrenalin, wo die tödliche Wirkung in äußerst kurzer Zeit (Minuten) eintritt, im Gegensatz zu den langen Zeiträumen (bis zu einigen Tagen) bei Diphtherietoxin.

Der Wert dieser dargelegten Berechnungsmethode kommt durch einen Vergleich der Berechnungen von Madsen und Noguchi¹⁾ an filtrierten und unfiltrierten Proben von Kobragift gut zur Geltung. Sie berücksichtigt, wie schon betont, nicht nur die Größe und Oberfläche des Versuchstieres, sondern auch die zum Eintreten eines gewünschten Effekts (Tod) nötige Zeit. Und zugleich liefert sie Resultate, die (innerhalb einer bestimmten Tierart) ganz unabhängig sowohl von der Lebensdauer wie von der Größe des betreffenden Tieres sind.

Madsen und Noguchi schlossen aus ihren Versuchen mit Kobragift, daß die Toxizität nach Filtration durch einen Chamberland-Filter nicht erheblich abnehme. Dieses Ergebnis stand in entschiedenem Widerspruch zu ihrer weiteren Beobachtung, daß Crotalusgift nach ähnlicher Filtration um 50% in seiner Toxizität herabgesetzt wird.

In Tabelle VII und VIII haben wir Daten über Kobragift (aus Tabelle XIX und XXIX der Autoren) mit unserer Formel berechnet. Unsere Ergebnisse lehren, daß die Giftigkeit des Kobragiftes durch den Filtrationsprozeß bedeutend abgenommen hatte, da die „Oberflächendosis“ des filtrierten Giftes, die ein Meerschweinchen mit Sicherheit tötet, 50% größer als die des unfiltrierten ist. Aus den Tabellen ersieht man auch, daß die beobachteten Zeiten bis zum Tode mit den nach unserer Formel berechneten befriedigend übereinstimmen,

¹⁾ Th. Madsen und H. Noguchi, Kgl. Danske Videnskabernes Selskabs Forhandling 1906, Nr. 4, S. 233.

Tabelle VII.

Unfiltriertes Kobragift, Meerschweinchen subcutan injiziert.

(Versuche von Madsen und Noguchi.)

$$\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k(T_0 - T_1). \quad k = 110, \alpha = 185, (T_0 = 1,70, D_0 = 1418).$$

Nr.	Tiergewicht	Wirkliche Dosis (d)	Dosis (D) im Verhältnis z. Oberfläche $D = \frac{d}{W^{0,72}} \times 10^6$	Beobachtete Stunden bis zum Tode = T beob.	Berechnete Stunden bis zum Tode = T ber.
	g	mg	mg		
1	650	0,05	47,1	∞	—
2	650	0,10	94,1	552	—
3	650	0,15	141,2	∞	—
4	650	0,20	188,3	36,0	—
5	650	0,25	235,6	18,48	18,90
6	650	0,30	282,4	12,00	10,30
7	650	0,50	471,0	3,58	4,14
8	650	0,75	706,0	2,05	2,71
9	650	1,00	943,0	3,57	2,16
10	650	1,50	1413,0	1,50	1,70

Tabelle VIII.

Filtriertes Kobragift, Meerschweinchen subcutan injiziert.

(Versuche von Madsen und Noguchi.)

$$\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k(T_0 - T_1). \quad k = 130, \alpha = 270, (T_0 = 3,98, D_0 = 546).$$

Nr.	Tiergewicht	Wirkliche Dosis (d)	Dosis (D) im Verhältnis z. Oberfläche $D = \frac{d}{W^{0,72}} \times 10^6$	Beobachtete Stunden bis zum Tode = T beob.	Berechnete Stunden bis zum Tode = T ber.
	g	mg	mg		
1	530	0,10	109,0	∞	—
2	470	0,15	179,0	∞	—
3	550	0,20	213,0	∞	—
4	480	0,20	234,0	∞	—
5	530	0,25	272,8	17,0	—
6	450	0,25	308,0	∞	—
7	460	0,30	362,6	13,0	—
8	560	0,40	421,0	6,18	6,29
9	450	0,40	493,0	4,65	4,64
10	530	0,50	546,0	3,98	3,98
11	450	0,50	616,0	2,58	3,42
12	580	1,00	1023,0	3,67	2,21
13	460	1,00	1210,0	1,98	2,01
14	620	1,50	1467,0	1,70	1,83
15	600	2,00	2000,0	1,72	1,64

namentlich wenn man bedenkt, daß wir es hier mit Einzelbeobachtungen und nicht mit Versuchsgruppen zu tun haben. Die anscheinend bestehenden Unstimmigkeiten würden wegfallen, wenn die Versuche in der üblichen Weise zusammengestellt wären.

Das vorgehend dargelegte Beweismaterial läßt es nun vielleicht unnötig erscheinen, daß wir zur Präzisierung der Anwendungsweise der mitgeteilten Formel noch mehr Einzelberechnungen von Versuchen anführen, die sich mit Fragen der Giftigkeit und Dosierung befassen. Wir wollen aber doch nicht unerwähnt lassen, daß die Formel sich ausgezeichnet bewährt hat in allen veröffentlichten Arbeiten, die wir, wenn genügende Angaben vorlagen, damit durchgerechnet haben. Unter den Untersuchungen, die wir von diesem Gesichtspunkte aus einer Prüfung unterzogen haben und die eine mathematische Berechnung mit der Formel zulassen, sind folgende: Knorrs Versuche mit Tetanustoxin, das Mäusen subcutan injiziert wurde¹⁾, Elliott, Sillar und Carmichaels Versuche mit subcutan injiziertem Kraitgift (Kaninchen)²⁾, Versuche von Fraser und Elliott mit dem Gift von *Enhydrina valacadica*, das Kaninchen unter die Haut gespritzt wurde³⁾, natürliches Adrenalin an Mäusen, Schultz⁴⁾; Sulfat von Physostigma, Subcutaneinspritzung bei Kaninchen, Fraser⁵⁾; Kaffein, subcutan Meerschweinchen und Ratten eingespritzt, Salant und Rieger⁶⁾; Kobaltnitrat, subcutan bei Meerschweinchen, Bock⁷⁾; und Kaliumchlorid, Kaninchen intravenös eingespritzt, Hald⁸⁾.

Diese Tatsachen berechtigen uns zu dem Schluß, daß, soweit wir bis jetzt überblicken können, die Formel in bezug auf

¹⁾ A. Knorr, Habilitationsschrift. Marburg 1895.

²⁾ R. H. Elliott, W. C. Sillar und G. S. Charmichael, Phil. Trans. B. 197, 327, 1905.

³⁾ J. R. Fraser und R. H. Elliott, Phil. Trans. B. 197, 249, 1905.

⁴⁾ W. H. Schultz, l. c.

⁵⁾ J. R. Fraser, Trans. Roy. Soc. of Edinburgh 26, 529, 1872.

⁶⁾ W. Salant und J. B. Rieger, U. S. Dept. of Agric. Bureau of Chem. Bull. Nr. 148. Washington 1912.

⁷⁾ J. Bock, Oversigt over det Kgl. danske Videnskabernes Selskabs Forhandling 1904, Nr. 4, S. 159.

⁸⁾ P. T. Hald, Kaliums Virkning paa Blodomløbet. Dissert. København 1904.

Dosierung und Todeszeit auf warmblütige Tiere allgemein anwendbar ist.

Daß sie auch nicht im Stiche läßt, wenn es sich nicht nur um letale Effekte, sondern auch um gewöhnliche pharmakologische und toxische Wirkung im allgemeinen handelt, erhellt aus den Versuchen von Schultz (l. c.) über die pupillenerweiternde Wirkung von synthetischem Adrenalin am geschnittenen Froschauge. Diese Versuche haben wir in Tabelle IX analysiert und berechnet. Wie ersichtlich, sind die Abweichungen zwischen den beobachteten Zeiten des Autors und den nach unserer Formel ermittelten, außer in einem Falle, prozentisch sehr klein und ergeben mit Einschluß der einen aus der Reihe fallenden Zahl eine Durchschnittsdifferenz von nur 2,73%.

Tabelle IX.

Mydriatische Wirkung von synthetischem Adrenalin auf das ausgeschnittene Froschauge.

(Versuche von Schultz.)

$$\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k(T_0 - T_1). \quad k \times 10^6 = 805, \quad \alpha = 2,2, \quad (T_0 = 20, D_0 = 500).$$

Nr.	D = relative Dosis, d. i. Konzentration der angewendeten Lösung	Zeit z. Auslösung d. mydriatischen Effekts = T beobachtet Min.	Berechnete Zeit z. Auslös. d. mydriatischen Effekts = T berechnet Min.	Differenz in % zwischen T berechnet und T beobachtet
1	1000	21	18,8	11,70
2	500	20	20,0	0,00
3	200	24	23,8	0,84
4	40	50	50,4	0,99
5	8	232	231,7	0,13
			Durchschnitt	2,73

Ein weiteres Beispiel für die Anwendungsfähigkeit der Formel bezog sich auf die Prüfung einer Giftlösung, in die eine Crustacee (Gammarus) getaucht wurde. Die Beobachtungen sind den Arbeiten von Wo. Ostwald und Dernoschek) entnommen. Diese Autoren abstrahierten aus ihren Untersuchungen die bereits erwähnte Formel $\frac{1}{T} = k(c-n)^m$, die auf einer Betrachtung des Adsorptionsphänomens basiert. Wie aber später

dargelegt wird, können ihre Ergebnisse sogar noch treffender mit der hier vorgeschlagenen als mit ihrer eigenen Formel ausgedrückt werden. Es darf übrigens nicht übersehen werden, daß die Formel ebenso gut am Platze ist, wenn es sich um Versuche handelt, zu denen Warmblüter mit einer großen Reihe von toxischen Substanzen behandelt werden wie bei den jetzt zu besprechenden Untersuchungen. Sie gibt eine prompte Erklärung für die in jedem Einzelfall beobachteten Tatsachen und kann leicht interpretiert werden. In Tabelle X und XI sind die Beobachtungen an männlichen und weiblichen Gammarus von Ostwald und Dernoschek mit ihren eigenen und unseren neuen Berechnungen kollationiert. Die neue Formel liefert für die männlichen Tiere gleich gute Resultate, denn der Unterschied (ohne Rücksicht auf die Vorzeichen) zwischen der eingetroffenen und der berechneten Todeswirkung beträgt im Durchschnitt 4,48% nach Ostwald und Dernoscheks System, nach dem unsrigen nur 4,50%. Für die weiblichen Tiere ist die Differenz im Durchschnitt nach den Autoren 5,94, nach unserer Formel nur 4,42%.

Tabelle X.

Untersuchungen an und Berechnungen für Gammarus.

Immersion in Seewasser. (Versuche von Ostwald und Dernoschek.)
Männliche Tiere.

$$\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k(T_0 - T_1). k \times 10^6 = 841, \alpha = 24,6, (T_0 = 39, D_0 = 58,7).$$

Nr.	$D = \text{proport. Dosis} = \text{Konzentr. d. angew. Dosis}$ %	Zeit bis zum Tode = T beobachtet Min.	Zeit bis z. Tode nach der neuen Formel berechnet = T berechnet	Differenz zwischen T berechnet u. T beobachtet Min.	Zeit bis z. Tode nach Ostwalds Formel berechnet = t berechnet	Differenz zwischen t berechnet u. T beobachtet Min.
1	58,7	36	39,0	- 3,0	35,3	+ 0,7
2	47,2	48	56,7	- 8,7	54,3	- 6,3
3	44,8	60	63,0	- 3,0	61,0	- 1,0
4	42,5	75	70,6	+ 4,4	69,1	+ 5,9
5	40,1	79	80,8	- 1,8	80,1	- 1,1
6	37,7	101	94,9	+ 6,1	95,0	+ 6,0
7	35,4	120	114,2	+ 5,8	115,4	+ 4,6
8	33,0	147	145,6	+ 1,4	148,3	- 1,3
9	30,6	192	202,3	- 10,3	205,6	- 13,6
10	28,3	326	325,5	+ 0,5	321,7	+ 4,3

Tabelle XI.

Untersuchungen an und Berechnungen für Gammarus.
Immersion in Seewasser. (Versuche von Ostwald und Dernoschek.)
Weibliche Tiere.

$$\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k(T_0 - T_1). k \times 10^6 = 1055, \alpha = 23, (T_0 = 30,5, D_0 = 58,7).$$

Nr.	$D = \text{proport. Dosis} = \text{Konzentr. d. angew. Dosis}$	$\text{Zeit bis zum Tode} = T$	$\text{Zeit bis z. Tode nach der neuen Formel berechnet} = T$	$\text{Differenz zwischen } T \text{ beobachtet u. } T \text{ berechnet}$	$\text{Zeit bis z. Tode nach Ostwalds Formel berechnet} = t$	$\text{Differenz zwischen } T \text{ beobachtet u. } t \text{ berechnet}$
	%	Min.	Min.	Min.	Min.	Min.
1	58,7	36	30,5	+ 5,5	34,7	+ 1,3
2	47,2	46	43,1	+ 2,9	44,9	+ 1,1
3	44,8	50	47,4	+ 2,6	50,0	0,0
4	42,5	50	52,6	- 2,6	54,4	- 4,4
5	40,1	53	59,4	- 6,4	60,1	- 7,1
6	37,7	67	68,4	- 1,4	67,6	- 0,6
7	35,4	77	80,4	- 3,4	77,3	- 0,3
8	33,0	86	98,7	- 12,7	92,1	- 6,1
9	30,6	127	128,7	- 1,7	116,3	+ 10,7
10	28,3	185	182,8	+ 2,2	162,3	+ 22,7
11	25,9	328	330,8	- 2,8	333,1	- 5,1

Verfolgt man außerdem im einzelnen, auf welche Art und Weise sie zu ihren Resultaten gelangen, so sieht man, daß das n in ihrer Formel für die widerstandsfähigeren männlichen Tiere eine kleinere Zahl ist als für die weiblichen, nämlich 23,88 und 24,55 %.

Unserer Meinung nach kann n (α bei uns) nur dann eine rationelle Bedeutung haben, wenn es den „unwirksamen“ Teil der Dosis darstellt, und der muß notwendigerweise größer für das kräftigere Geschlecht sein. Nach unserem Verfahren besitzt andererseits α , wie logisch zu erwarten, einen höheren Wert für die Männchen als für die Weibchen, 24,6 für die männlichen Gammarus gegenüber 23,0 für die weiblichen.

Aus diesen Versuchen mit Gammarus geht wieder klar hervor, daß die relative Giftigkeit von Seewasser für die beiden Geschlechter durch einen direkten Vergleich der Lebensdauer der Tiere mit einer bestimmten Konzentration der Lösung nicht genau festgestellt werden kann. Das ergibt sich schon aus der Tatsache, daß das Verhältnis dieser Zeiten zueinander kein konstantes ist, sondern bei Änderungen in

der Stärke der Lösung bedeutend variiert. So sterben bei einer 58,7%igen Konzentration männliche und weibliche Tiere in 36 Minuten ($\frac{T_1}{T_2} = 1,00$), bei einer solchen von 40,1%, sterben die männlichen in 79 Minuten und die weiblichen in 53 Minuten ($\frac{T_1}{T_2} = 1,49$), und schließlich bei einer Konzentration von 28,3% gehen die Männchen in 326 Minuten ein, die Weibchen nach 185 Min. ($\frac{T_1}{T_2} = 1,76$). Wird die Lösung auf 25,9% herabgesetzt, so sterben die Weibchen in 328 Minuten ab, die Männchen dagegen bleiben leben.

Schlußfolgerungen.

1. Bei Warmblütern muß die Dosierung (D) von Giftpräparaten, wie in einer früheren Arbeit¹⁾ bewiesen worden ist, im Verhältnis zur Körperoberfläche gemäß der Formel $D = \frac{d}{W^{0,72}}$ berechnet werden. Darin ist D die „Oberflächendosis“ des angewendeten Präparates, Toxins oder Antitoxins, d die wirklich verabfolgte Menge und W das Tiergewicht in Grammen.

2. Es lag bisher noch keine Methode vor, die einen wahren Vergleich der relativen Giftigkeit verschiedener Substanzen (oder verschiedener Proben ein und derselben Substanz) gestattet. Die bis heute angewandten Methoden sind von der Wahl eines willkürlich angenommenen Tiergewichts und einer willkürlich festgesetzten Zeitdauer bis zum Eintritt des Todes abhängig. Infolgedessen fehlt ihnen eine rationelle Basis zur exakten Messung und Eichung von Drogen, Toxinen und Antitoxinen.

3. Mit Hilfe der hier vorgeschlagenen Formel $\frac{1}{D_0 - \alpha} - \frac{1}{D_1 - \alpha} = k(T_0 - T_1)$ kann man leicht und bequem solche Messungen anstellen. Darin bedeuten D_0 und D_1 die Konzentrationen der Präparate oder „Oberflächendosen“, entsprechend den Zeiten T_0 und T_1 , in denen die tödliche (oder irgendeine andere gewünschte) Wirkung für das Tier erfolgt; α ist eine die „unwirksame“ Dosis der verwendeten Substanz darstellende Zahl;

¹⁾ Dreyer und Ainley Walker, l. c.

k ist schließlich eine Konstante, die erst für die betreffende Substanz und Tierspezies bestimmt werden muß.

4. Die Formel besagt, daß jedem gleich großen Zeitzuwachs eine bestimmte Abnahme in der wirksamen Dosis ($D - \alpha$) entspricht.

5. Es wird gezeigt, daß diese Formel für alle die verschiedenen Versuchsergebnisse, auf die sie angewandt wurde, ein sehr prägnantes Ausdrucksmittel ist.

6. Mit Hilfe dieser Formel kann man nicht nur etwa erwünschte Vergleiche ausführen, sondern auch Tiere von jeder Größe und im Bereiche einer sich in sehr weiten Grenzen bewegenden Gewichtsskala innerhalb einer Tierart, ohne sich an eine bestimmte Tötungszeit zu binden, zur Eichung von toxischen, antitoxischen und dergleichen Substanzen benutzen.

7. Auf diese Weise wird eine große Ersparnis sowohl an Zeit wie an Tiermaterial bewirkt, da nun, unabhängig von der wirklichen Lebensdauer und dem Gewicht des jeweiligen Tieres, gleiche Bedeutung allen auf experimentellem Wege gefundenen Ergebnissen zugeschrieben werden kann.

8. Die erhaltenen Resultate werden auch größere Giftigkeit und ausgedehntere Anwendungsbreite anzeigen, als es bis jetzt unter den Bedingungen der willkürlich gewählten Zeiten bis zum Tode und des festgesetzten Einheitsgewichtes der Versuchstiere möglich war.

Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen.

I. Hämolysen bei gleichzeitiger Einwirkung von Neutralsalzen und anderen cytolysierenden Stoffen.

Von

Rudolf Höber und Otto Nast.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 27. Januar 1914.)

Einleitung.

Es ist eine lange bekannte Tatsache, daß sich der Speziescharakter bei den höheren Tieren in der eigenartigen Form und Größe der einzelnen roten Blutkörperchen in ähnlichem Maß dokumentiert wie in der äußeren Gestalt des ganzen Tieres; ein Kamel kann man etwa gerade so gut an seinen elliptischen Blutkörperchen erkennen, wie an seinem Höcker. Den arteigenen Abmessungen entspricht die arteigene chemische oder physikochemische Beschaffenheit. Darüber belehrt nicht erst der Nachweis der Artspezifität der Eiweißkörper mit Hilfe der „biologischen Reaktion“, sondern die bekannten verschiedenen Krystallformen des Hämoglobins besagen bereits dasselbe. Zu der Arteigenheit der einzelnen chemischen Verbindungen von komplizierter Struktur wie der der Eiweißkörper gesellen sich die arteigenen Gemische der einfachen chemischen Baustoffe in den Blutkörperchen; aus den bekannten Aschenanalysen von Abderhalden ist zu ersehen, daß die Salzmischung in den roten Blutkörperchen von Art zu Art charakteristisch differiert. Und damit hängt dann wieder die Variabilität in der Form der Dissoziationskurven des Oxyhämoglobins von Tier zu Tier zusammen; denn durch die Untersuchungen von Barcroft und Camis¹⁾ ist festgestellt, daß ein

¹⁾ Barcroft und Camis, Journ. of Physiol. **29**, 118, 1909.

und dieselbe Oxyhämoglobinlösung in der artspezifisch verschiedenen Weise dissoziiert, je nachdem das Salzgemisch der Blutkörperchen von der einen oder der anderen Tierart zugesetzt ist. Hiermit betreten wir nun schon das Gebiet physiologischer Artunterschiede, das etwa gegen das Gebiet der rein morphologischen und der rein chemischen Artunterschiede abzugrenzen wäre — freilich nur insofern, als wir im allgemeinen nicht völlig analysierte Funktionen lebender Gebilde als physiologische den rein chemischen und rein physikalischen Eigenschaften gegenüberstellen. Von der arteigenen Salzmischung ist u. a. wohl auch eine andere physiologische Eigenschaft der roten Blutkörperchen abhängig, von der in dieser Abhandlung die Rede sein soll, nämlich die Resistenz gegen cytolysierende Agenzien.

Wenn man sich die Frage vorlegt, welche Bedeutung die Binnensalze der Zellen für deren Leben haben, so wird man verschiedene Möglichkeiten ins Auge fassen. Die Aktionsströme als Äußerungen von Ionenbewegungen werden als mögliche Bedingung für den noch ganz unaufgeklärten Vorgang der Fortleitung der Erregung zu diskutieren sein. Bernsteins Hypothese eines elektroosmotischen Druckes könnte vielleicht auch mit erwogen werden¹⁾. Der eine von uns (H.) ist auf Grund früherer Untersuchungen zu der Annahme gekommen, daß die Binnenelektrolyte durch Einwirkung auf die verschiedenen Zellkolloide eine bestimmte Protoplasmakonsistenz garantieren. Rywosch²⁾ hat nämlich gefunden, daß die Resistenz der Blutkörperchen gegen Hypotonie und die Resistenz gegen Saponin in folgender Reihenfolge abnimmt:

Hypotonie: Meerschweinchen > weiße Ratte > Hund > graue Ratte > Kaninchen > Schwein > Maus > Katze > Rind > Ziege > Hammel.

Saponin: Hammel > Ziege > Rind > Katze > Maus > Schwein > graue Ratte > Hund > weiße Ratte > Kaninchen > Meerschweinchen.

Vergleicht man die beiden Reihen, so bemerkt man sofort den Antagonismus: je resistenter eine Blutkörperchensorte gegen

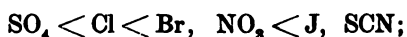
¹⁾ Bernstein, Elektrobiologie. Braunschweig 1912.

²⁾ Rywosch, Arch. f. d. ges. Physiol. 116, 229, 1907.

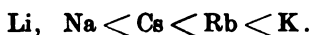
Saponin ist, um so empfindlicher ist sie gegen Hypotonie, und umgekehrt. Port¹⁾ hat dann weiter darauf aufmerksam gemacht, daß die gleiche Reihenfolge der Tiere herauskommt, wenn man sie nach dem Gehalt der Blutkörperchen an anorganischer Phosphorsäure nach den Analysen von Abderhalden ordnet:

Hammel 0,275	Phosphorsäure	Hund . . .	1,298	Phosphorsäure
Ziege . . .	0,279	”	Schwein . .	1,653
Rind . . .	0,350	”	Kaninchen	1,733
Katze . . .	1,186	”		”

Daraus schloß Port, daß die Resistenz der Blutkörperchen mit den Binnenphosphaten irgendetwas zu tun haben müsse. Der eine von uns²⁾ hat sodann die Vermutung ausgesprochen, daß das vermittelnde Glied zwischen Resistenz und Phosphorsäuregehalt der Einfluß der Phosphate auf die Protoplasma-kolloide darstelle, und zwar auf Grund folgender weiterer Zusammenhänge: Während in annähernd isotonischen Lösungen der neutralen Alkalisalze Blutkörperchen zunächst unverändert bleiben, gehen sie nach längerer Zeit unter Loslassung ihres Farbstoffs zugrunde, aber je nach dem Salz nach verschieden langer Zeit. Vergleicht man Salze mit gleichem Kation untereinander, so findet man³⁾, daß die Hämolysegeschwindigkeit zunimmt nach der Reihe der Anionen:



vergleicht man Alkalisalze mit gleichem Anion, so findet man die Kationenreihe:



Dies gilt sowohl für die Blutkörperchen vom Rind, als auch für diejenigen von Schwein, Hammel, Katze, Kaninchen⁴⁾. Da nun diese selben Ionenreihen nach Hofmeister, Pauli und Höber auch beim Einfluß der Salze auf den Lösungszustand von Eiweiß und Lecithin und auf die Konsistenz von

¹⁾ Port, *Deutsch. Arch. f. klin. Med.* 99, 259, 1910.

²⁾ Höber, *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*. 3. Aufl. 1911. S. 401.

³⁾ Höber, *diese Zeitschr.* 14, 209, 1908.

⁴⁾ R. Chassin, *Neue Versuche über Hämolyse durch Salze*. Diss. Zürich. 1910.

Gelatinegallerte zur Geltung kommen, so kann man annehmen, daß die Salzwirkung eine Wirkung auf die Kolloide der Blutkörperchen ist, und daß die Hämolyse eintritt, wenn die Blutkörperchensubstanz über ein gewisses Maß hinaus aufgelockert ist.

Weiter wurde von Port, Miculicich¹⁾, Teruuchi²⁾ beobachtet, daß, wenn man die Wirkung der Salze auf die Blutkörperchen mit dem Einfluß von Saponin oder von Vibriolysin kombiniert, die Anionen in der der genannten entgegengesetzten Reihenfolge verstärkend wirken, so daß nun das SO_4 -Ion die Hämolyse am meisten, das J- und SCN -Ion am wenigsten fördern. Auch die Kationenreihe wird eventuell umgedreht. Auch diese Tatsachen legen wiederum nahe, daß die Hämolyse auf einem Angriff auf die Kolloide beruht. Denn von Posternak, Pauli und dem einen von uns ist gezeigt worden, daß die Abstufung in der relativen Wirksamkeit der genannten Ionen auch gegenüber Eiweiß und anderen Kolloiden umgedreht werden kann, wenn man die elektrische Ladung der Kolloide ändert. Hierzu eignen sich besonders H^+ - und OH^- -Ionen, aber auch mehrwertige Metall- oder Säureionen sowie Kolloide, die selbst Ladungen zu führen pflegen, können dafür verwendet werden. Nun ist es sehr charakteristisch, daß das in den Versuchen von Port, Miculicich und Teruuchi wirkende zweite Agens, das die Umdrehung der Ionenreihe verursacht, kolloid ist; denn sowohl Saponin wie Vibriolysin bilden kolloide Lösungen. Nichtkolloide Stoffe, wie Urethan oder Alkohol, die ebenfalls die Hämolyse verstärken, bewirken dagegen in den Versuchen von Miculicich keinerlei Änderung in der gegenseitigen Wirkungsstärke der Ionen im Vergleich zur Norm. Wohl aber verändert dann wiederum Natronlauge, also OH^- , in den Versuchen von Teruuchi die Abstufung der Anionenfolge.

Auf Grund dieser Versuche hatte der eine von uns den vorher angeführten Versuchen von Rywosch folgende Deutung gegeben: Die Resistenz der Blutkörperchen gegen eine hypotonische Salzlösung ist um so größer, je größer der Gehalt an Binnenphosphat, weil die Phosphationen, ähnlich wie die SO_4 -

¹⁾ Miculicich, Centralbl. f. Physiol. 24, 523, 1910.

²⁾ Teruuchi, Communication de l'Institut Sérothér. de l'Etat danois 3, 1909.

oder Tartrationen, im allgemeinen die Konsistenz der Protoplasmakolloide erhöhen; behandelt man aber die Blutkörperchen mit Saponin, so wird die Ladung der Protoplasmakolloide in der Art geändert, daß die fällungskräftigsten Ionen, wie die Phosphat- oder Sulfationen, nun die größte Lösungsfähigkeit erhalten; daher zeigen diejenigen Blutkörperchen, die am meisten Phosphat enthalten, nunmehr die geringste Resistenz.

Es wird also den Binnenelektrolyten zum Zweck der Deutung all dieser Versuche die bestimmte Funktion beigelegt, den Zellen eine gewisse von Art zu Art verschiedene Starre zu garantieren. Durch die im folgenden zu beschreibenden Versuche wird diese Ansicht eine weitere Stütze erhalten.

Versuche.

Im Anschluß an die Versuche von Port, Miculicich und Teruuchi wurde der Einfluß von Alkalisalzen mit demjenigen verschiedener typischer cytolysierender Agenzien kombiniert. Es zeigte sich bald, daß für den Effekt maßgebend ist, von welcher Tierart die Blutkörperchen stammen.

Die einfache Versuchstechnik war die folgende: Es wurde eine Serie von Salzlösungen hergestellt, deren Konzentration so lange variiert wurde, bis bei sorgfältiger Kryoskopie mit dem Apparat von Dekhuyzen¹⁾ die Gefrierpunkte nur noch um wenige tausendstel Grade voneinander abwichen. In gleiche Quanta Lösung wurden dann die gleichen Quanta Blutkörperchen einpipettiert, die durch einmaliges scharfes Zentrifugieren und Abhebern des Plasmas erhalten waren. Dann wurde in jedes Gemisch so viel Hämolyticum-Lösung einpipettiert, daß die Hämolyse bei Zimmertemperatur in einigen Minuten bis einigen Stunden zustande kam. Bei Versuchen, in denen die Hämolyse sich in einigen Minuten vollzog, mußte natürlich der Zeitpunkt der Mischung für jedes einzelne Röhrchen beachtet werden; in den im folgenden wiedergegebenen Protokollen ist daher öfter angegeben, in welcher Reihenfolge die Suspensionen der Blutkörperchen in den verschiedenen Lösungen mit Hämolyticum beschickt wurden.

¹⁾ Dekhuyzen, diese Zeitschr. 11, 346, 1908.

I. Die Wirkung der Alkali-Kationen.

Zur Ermittlung der relativen Wirksamkeit der Kationen dienten Lösungen der Chloride.

1. Versuche mit Saponin. Als Saponinpräparat wurde Saponin pur. albissimum Merck verwendet. Die Hauptergebnisse lassen sich in folgende Tabelle zusammenfassen:

Pferd	Li < Na < Rb < K
Schwein	Na < Li < Rb < K
Kaninchen	Na < Li < Rb < K
Meerschweinchen	Li < Na < Rb < K
Hund	Li < Na < K < Rb und Li < K < Na < Rb
Katze	Li = Na = Rb = K
Ziege	Li > Na > Rb > K
Mensch	Li > Na > Rb > K
Rind	Li > Na > Rb > K
Hammel	Li > Na > Rb > K

Danach sind unter den untersuchten Blutkörperchenarten zwei Hauptgruppen zu unterscheiden; die eine umfaßt die Körperchen von Pferd, Schwein, Kaninchen und Meerschweinchen, mit der Reihenfolge der Kationenwirksamkeiten: Li < Na < Rb < K, die andere umfaßt Ziege, Mensch, Rind und Hammel mit der Reihenfolge: Li > Na > Rb > K; die Körperchen von Hund und Katze repräsentieren dann Übergangsglieder zwischen den beiden Hauptgruppen.

Es sind nun noch einige besondere Bemerkungen an die summarische Mitteilung der Ergebnisse anzuknüpfen.

Es wurde bemerkt, daß, wenn die Hämolyse in den reinen Salzlösungen zustande kommt, die Kationen in der Reihenfolge: Li < Na < Rb < K wirksam sind. Wenn nun diese Reihe durch den weiteren Zusatz eines zweiten Hämolyticums umgedreht werden kann, so ist es selbstverständlich, daß diese Umdrehung erst zustande kommen wird, wenn der Zusatz eine gewisse Grenzkonzentration überschritten hat. So wurde z. B. folgendes gefunden:

Blutkörperchen vom Menschen.

0,05 ccm Saponin (0,2^o/_oig) + 0,1 ccm Blutkörperchen
+ 2 ccm Salzlösung: Li, Na < Rb < K;

0,07 ccm Saponin (0,2⁰/₀ig) + 0,1 ccm Blutkörperchen
+ 2 ccm Salzlösung: Li = Na = Rb = K;

0,1 ccm Saponin (0,2⁰/₀ig) + 0,1 ccm Blutkörperchen
+ 2 ccm Salzlösung: Li > Na > Rb > K.

Daraus ist aber nicht etwa der Schluß zu ziehen, daß nun in jedem Fall durch reichlichen Zusatz von zweitem Hämolyticum die ursprüngliche Ionenreihe umgedreht werden kann. Sondern bei den in der ersten Gruppe vereinigten Tieren lautet auch bei der raschesten Hämolyse, die noch beobachtet werden kann, die Reihenfolge stets ebenso wie auch in den reinen Salzlösungen: Li < Na < Rb < K. Folgende Beispiele mögen das Verhalten illustrieren:

Blutkörperchen vom Pferd.

- | | |
|--|---|
| 1. 0,05 ccm Saponin (0,2 ⁰ / ₀ ig)
+ 0,15 ccm Blutk. + 2 ccm Salz-
lösung. | 2. 0,05 ccm Saponin (0,2 ⁰ / ₀ ig)
+ 0,1 ccm Blutk. + 2 ccm Salz-
lösung. |
| 10 ^h 23' bis 24' Saponinzusatz erst
zu Li, dann Na, Rb, K | 9 ^h 56' bis 58' Saponinzusatz in
Reihenfolge Li Na Rb K |
| 10 ^h 32' Li < Na Rb K | 10 ^h 03' Li Na K < Rb |
| 10 ^h 42' Li < Na Rb K | 10 ^h 04' Li Na < K < Rb |
| 10 ^h 57' Li < Na Rb K | 10 ^h 06' Li Na ≤ K < Rb |
| 11 ^h 37' Li < Na Rb K | 10 ^h 15' Li Na ≤ K < Rb |
| 3 ^h 20' Li < Na ≤ Rb < K | |
| 4 ^h 00' Li < Na ≤ Rb < K | |

Blutkörperchen vom Schwein.

- | | |
|---|--|
| 1. 0,05 ccm Sapotoxin (1 ⁰ / ₀ ig)
+ 0,2 ccm Blutk. + 5 ccm Salz-
lösung. | 2. 0,1 ccm Sapotoxin (1 ⁰ / ₀ ig)
+ 0,2 ccm Blutk. + 5 ccm Salz-
lösung. |
| 6 ^h 06' Beginn | 3 ^h 23' Beginn |
| 6 ^h 35' alle gleich | 4 ^h 06' Li Na < Rb K |
| 8 ^h 40' Li < Na < Rb = K | 4 ^h 13' Li Na < Rb ≤ K |
| 9 ^h 50' Li < Na < Rb < K | 4 ^h 32' Li Na < Rb < K |
| 3. 0,2 ccm Sapotoxin (1 ⁰ / ₀ ig) + 0,2 ccm Blutk.
+ 5 ccm Salzlösung. | |
| 3 ^h 47' Beginn | |
| 3 ^h 52' Li Na < Rb < K | |
| 3 ^h 57' Li Na < Rb < K | |
| 4 ^h 07' Li Na < Rb < K | |

Es ist also bei gewissen Blutkörperchensorten die ursprüngliche Ionenreihe absolut nicht in die inverse Reihe umzukehren.

Die Übergangstellung von Hund und Katze dokumentiert sich in folgendem: Bei den Blutkörperchen der Katze war es überhaupt nicht möglich, eine bestimmte Hämolyseregel herauszufinden; im wesentlichen wirkten alle vier Salzlösungen gleich stark, d. h. manchmal verlief die Hämolyse im Sinn der Reihe: $\text{Li Na} < \text{Rb K}$, manchmal im Gegensinn, aber immer wenig ausgesprochen und ohne sichere Beziehung zur Relation zwischen Blutkörperchen- und Hämolyticummenge. Bei den Hundeblutkörperchen ergaben sich insofern unregelmäßige Verhältnisse, als bei höheren Saponinkonzentrationen an die Stelle der Reihe: $\text{Li} < \text{Na} < \text{Rb} < \text{K}$ die Reihe: $\text{Li} < \text{K} < \text{Na} < \text{Rb}$ trat, und zwar so, daß die zweite Reihe innerhalb eines Versuches allmählich aus der ersten entstand; z. B.:

Blutkörperchen vom Hund.

0,15 ccm Saponin (0,2% ig) + 0,1 ccm Blutk. + 2 ccm Salzlösung.

4^h34' bis 35' Saponinzusatz in Reihenfolge Li Na Rb K

4^h38' $\text{Li} < \text{Na} < \text{K} < \text{Rb}$

4^h40' $\text{Li} < \text{Na} < \text{K} < \text{Rb}$

4^h45' $\text{Li} < \text{Na K} < \text{Rb}$

4^h48' $\text{Li} < \text{K} < \text{Na} < \text{Rb}$

5^h00' $\text{Li} < \text{K} < \text{Na} < \text{Rb}$

6^h10' $\text{Li} < \text{K} < \text{Na} < \text{Rb}$

6^h50' $\text{Li} < \text{K} < \text{Na} < \text{Rb}$

2. Versuche mit Sapotoxin. Zu den Versuchen wurde Sapotoxin von Merck verwendet. Die Hauptergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Pferd	$\text{Li} < \text{Na} < \text{Rb} < \text{K}$
Schwein	$\text{Li} \leq \text{Na} < \text{Rb} < \text{K}$
Kaninchen	$\text{Li} < \text{Na} < \text{Rb} < \text{K}$
Meerschweinchen	$\text{Li} < \text{Na} < \text{Rb} < \text{K}$
Hund	$\text{Li} \cong \text{Na} \cong \text{Rb} \cong \text{K}$
Katze	$\text{Li} \cong \text{Na} \cong \text{Rb} \cong \text{K}$
Ziege	$\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{Rb}$
Mensch	$\text{Li} > \text{Na} > \text{Rb}, \text{K}$
Rind	$\text{Li} > \text{Na} > \text{Rb}, \text{K}$
Hammel	$\text{Li} > \text{Na Rb} > \text{K}$

Die Tiere gruppieren sich also nach dem Verhalten ihrer Blutkörperchen genau so wie bei den Versuchen mit Saponin.

Die Zwischenstellung der Blutkörperchen von Hund und Katze äußert sich diesmal in folgender Art:

Die Hämolyse bei den Körperchen der Katze setzt in allen Lösungen fast zu gleicher Zeit ein, so daß Abstufungen oft kaum zu konstatieren sind. Die Versuche verliefen z. B. in folgender Art:

Blutkörperchen der Katze.

1. 0,05 ccm Sapotoxin (0,33%ig) + 0,1 ccm Blutk.
+ 2 ccm Salzlösung.

3^h25' bis 26' Sapotoxinzusatz in Reihenfolge Li Na Rb K

3^h35' K Rb \geq Na Li

3^h41' alle fast gleich stark hämolysiert

3^h48' do.

3^h57' do.

4^h10' Rb \geq K Na Li

4^h27' Rb $>$ K \geq Na Li, Hämolyse fast total.

2. 0,15 ccm Sapotoxin (0,33%ig) + 0,1 ccm Blutk.
+ 2 ccm Salzlösung.

6^h02' bis 03' Sapotoxinzusatz in Reihenfolge K Rb Na Li

6^h06' Li $>$ Na $>$ Rb $>$ K, kaum verschieden

6^h10' totale Hämolyse.

In diesen zwei Versuchen kommt also je nach der relativen Menge von Sapotoxin die reguläre und die inverse Kationenreihe heraus; aber die Unterschiede zwischen den einzelnen Wirkungen sind erheblich undeutlicher als sonst.

Auch an den Blutkörperchen vom Hund war es schwer, Wirkungsdifferenzen der Ionen herauszubekommen; auch der folgende kompliziertere Verlauf der Hämolyse ist charakteristisch:

Blutkörperchen vom Hund.

0,05 ccm Sapotoxin (0,33^o/_oig) + 0,1 ccm Blutk.
+ 2 ccm Salzlösung.

9^h51' bis 52' Sapotoxinzusatz in der
Reihenfolge Li Na Rb K

10^h00' K > Rb, Na, Li
10^h03' K > Rb, Na > Li
10^h06' K > Na > Rb > Li
10^h23' Na > Li K > Rb
10^h26' Na > Li > Rb, K
3^h20' Na, Li > Rb, K

Also während des Versuches dreht sich allmählich die Ionenreihe um.

Das bisherige Ergebnis lautet demnach: Die Kombinationen Saponin—Alkaliionen und Sapotoxin—Alkaliionen haben den gleichen Effekt: Die Hämolyse der Blutkörperchen von Pferd, Schwein, Kaninchen, Meerschweinchen wird von den Kationen in der regulären Reihenfolge: Li < Na < Rb < K beeinflusst, die Hämolyse bei Ziege, Mensch, Rind, Hammel ergibt die inverse Reihe: Li > Na > Rb > K; Zwischenglieder bilden Katze und Hund.

Sucht man nach einer Erklärung hierfür, so findet sie sich unseres Erachtens in den Beziehungen zu den Binnenelektrolyten. Nach Abderhalden differiert der Salzgehalt der Blutkörperchen, soweit Untersuchungen bisher vorliegen, in der folgenden charakteristischen Art:

	Phosphor- säure	Kali	Natrium
Rind	0,350	0,722	2,232
Hammel . . .	0,365	0,741	2,257
Ziege	0,279	0,679	2,174
Hund	1,298	0,273	2,839
Katze	1,186	0,258	2,705
Pferd	1,687	4,130	—
Schwein . . .	1,653	4,957	—
Kaninchen . .	1,733	5,229	—

Danach bilden, gerade so wie bei der Hämolysierfähigkeit, Pferd, Schwein, Kaninchen eine Gruppe für sich, Rind, Hammel, Ziege eine andere Gruppe, und Hund und Katze nehmen eine

Zwischenstellung ein, weil sie sich im Phosphatgehalt mehr der einen, im Alkaligehalt mehr der anderen Gruppe anschließen. Außer dieser Beziehung zu den Binnenelektrolyten ist uns keine Beziehung der aufgefundenen Abstufung in der Hämolysefähigkeit zu anderen Eigenschaften der Blutkörperchen bekannt.

3. Versuche mit weiteren Hämolytica. Ähnliche Versuche stellten wir mit Kobragift + Lecithin, mit Agaricin, taurocholsaurem Natrium und Solaninum hydrochloricum an. Für das Kobragift sind wir Herrn Geheimen Rat Ehrlich zu großem Dank verpflichtet, die übrigen Präparate stammten von Merck; das Agaricin wurde in der Wärme unter Zusatz von Natriumbicarbonat in Lösung gebracht. Auch diese Hämolytica sind, das Solanin wenigstens als freie Base, kolloid gelöst.

Die Wirkung wurde an je zwei Vertretern der bei den vorigen Versuchen sich bildenden Gruppen von Blutkörperchen geprüft, nämlich an den Blutkörperchen von Schwein und Kaninchen einerseits, von Hammel und Rind andererseits. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

	Schwein	Kaninchen	Hammel	Rind
Kobragift (0,5%ig) + Lecithin (0,1%ig) . . .	Li < Na < K < Rb	Li < Na < Rb < K	Li < Na < K < Rb	Na < Li < K < Rb
Agaricin (1%ig) . . .	Li < Na < Rb < K	unregelmäßig	Li < Na < Rb < K	Li < Na < K < Rb
Taurocholsaures Na- trium (2%ig)	unregelmäßig	—	unregelmäßig	unregelmäßig
Solaninum hydrochlor. (0,05%ig)	do.	unregelmäßig	do.	do.

Was in der Tabelle mit „unregelmäßig“ gemeint ist, lehrt etwa folgende Gegenüberstellung der Endreihen in den mit Solanin und mit Sapotoxin an den Schweineblutkörperchen angestellten Versuchen:

Blutkörperchen vom Schwein.

Solanin:	Sapotoxin:
Li < Na < K < Rb	Li ≤ Na < Rb, K
Rb < Li < Na < K	Li < Na < Rb < K
Li < K < Na < Rb	Li, Na < Rb < K
Li < Rb < Na, K	Na < Li < Rb < K
Li < Na < K < Rb	Li, Na < Rb, K
Na < K ≤ Li < Rb	Li < Na < Rb < K
Na < K < Li < Rb	

Während also bei der Mitwirkung des Sapotoxins ganz einheitlich Li und Na die Hämolyse relativ wenig, Rb und K relativ stark fördern, stehen die Kationen bei der Kombination mit Solanin ganz regellos in der Wirkungsreihe bald hier, bald dort. Auch hiermit können wir wiederum am ersten an die Erfahrungen bei den hydrophilen Kolloiden anknüpfen, bei denen nur bei ausgesprochener Ladung in einem Sinne Li und Na an dem einen Ende der Wirkungsreihe, Rb und K an dem anderen Ende stehen, während bei weniger definierter Ladung die unregelmäßigen „Übergangsreihen“ zum Vorschein kommen¹⁾.

II. Die Wirkung der Anionen.

Zur Ermittlung der relativen Wirkungsstärke der Anionen dienten Lösungen von Natriumsalzen.

Nach den Untersuchungen des einen von uns wirken bei Abwesenheit eines weiteren Hämolyticums die Anionen in der bekannten lyotropen Reihe: $\text{SO}_4 < \text{Cl} < \text{Br}, \text{NO}_3 < \text{J}$. Bei Gegenwart von Saponin oder von Vibriolysin wirken dagegen die Anionen nach den zitierten Untersuchungen von Port, von Miculicich und von Teruuchi gegenüber den Blutkörperchen von Mensch, Rind und Pferd nach der entgegengesetzten Reihenfolge: $\text{SO}_4 > \text{Cl} > \text{Br}, \text{NO}_3 > \text{J}$. Wir können diese Angaben bestätigen und erweitern. Unsere Versuche erstrecken sich wiederum auf die Blutkörperchen von Schwein, Kaninchen, Rind und Hammel.

Bei Gegenwart von Saponin und Sapotoxin verstärken die Anionen in jedem Fall in der Reihenfolge: $\text{SO}_4 > \text{Cl} > \text{Br} > \text{NO}_3 > \text{J}$.

Bei Gegenwart von Kobragift findet man dagegen die reguläre Reihe: $\text{SO}_4 < \text{Cl}, \text{Br}, \text{NO}_3 < \text{J}$.

Unter der Mitwirkung von Solanin erhält die Reihe mit Regelmäßigkeit die etwas abweichende Form: $\text{SO}_4 < \text{J} \leq \text{Cl} < \text{Br}, \text{NO}_3$.

Agaricin und taurocholsaures Natrium endlich führen wieder zur Sonderung in die beiden Gruppen von Blutkörperchen,

¹⁾ Siehe besonders Höber, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 35, 1907.

die wir beim Studium der Kationenwirkungen fanden, deren einer die Blutkörperchen von Rind und Hammel, deren anderer die von Schwein und Kaninchen angehören.

Bei der Agaricinwirkung äußert sich diese Sonderung in folgender Weise: Die Blutkörperchen von Rind und Hammel hämolysieren meist entsprechend der regulären Folge: $\text{SO}_4 < \text{Cl} < \text{Br}, \text{NO}_3 < \text{J}$; die Körperchen von Schwein und Kaninchen werden dagegen im Versuchsanfang nach der regulären, später nach der inversen Reihe beeinflußt:

Blutkörperchen vom Hammel.

0,1 ccm Agaricin (1⁰/₀ig) + 0,25 ccm Blutkörperchen
+ 5 ccm Salzlösung.

3^h42' bis 43' Agaricinzusatz in Reihenfolge

$\text{SO}_4, \text{Cl}, \text{Br}, \text{NO}_3, \text{J}$

5^h05' $\text{SO}_4 < \text{Cl}, \text{Br}, \text{J} < \text{NO}_3$

5^h30' $\text{SO}_4 < \text{Cl}, \text{Br}, \text{J} < \text{NO}_3$

6^h20' $\text{SO}_4 < \text{Cl}, \text{Br}, \text{J} < \text{NO}_3$

8^h30' $\text{SO}_4 < \text{Cl} < \text{Br}, \text{J} \leq \text{NO}_3$.

Blutkörperchen vom Schwein.

0,1 ccm Agaricin (1⁰/₀ig) + 0,25 ccm Blutkörperchen + 5 ccm
Salzlösung.

11^h57' bis 58' Agaricinzusatz in Reihenfolge

$\text{SO}_4, \text{Cl}, \text{Br}, \text{NO}_3, \text{J}$

15^h03' $\text{SO}_4 < \text{Cl}, \text{Br}, \text{J} < \text{NO}_3$

3^h20' $\text{SO}_4 > \text{NO}_3 > \text{Cl}, \text{Br} > \text{J}$

4^h12' $\text{SO}_4 > \text{Cl}, \text{NO}_3 > \text{Br} > \text{J}$

4^h47' $\text{SO}_4 > \text{Cl} > \text{NO}_3 > \text{Br} > \text{J}$.

Ähnlich wirkt taurocholsaures Natrium, nur wirkt es stärker umdrehend, so daß hier die Blutkörperchen von Rind und Hammel anfangs nach der regulären, dann nach der inversen Reihe beeinflußt werden, während die Blutkörperchen von Kaninchen und Schwein von vornherein entsprechend der inversen Reihe: $\text{SO}_4 > \text{J} > \text{Cl} > \text{NO}_3 > \text{Br}$ sich auflösen. Dies zeigen folgende Beispiele:

Blutkörperchen vom Rind.

0,2 ccm tauroch. Na. (2⁰/₀ig) + 0,1 ccm Blutkörperchen + 5 ccm
Salzlösung.

10^h22' bis 23' Zusatz des tauroch. Na in Reihen-
folge J, Br, NO₃, Cl, SO₄

10^h49' SO₄ < Cl, Br, NO₃ < J

11^h06' SO₄ < Cl, Br, NO₃ < J

12^h06' NO₃ < Cl, Br < SO₄ < J

12^h16' NO₃ < Br < Cl < SO₄ < J

12^h45' NO₃ < Br, Cl < SO₄, J

4^h00' NO₃ < Br, Cl < J < SO₄

5^h15' NO₃ < Br, Cl < J < SO₄.

Blutkörperchen vom Kaninchen.

0,1 ccm tauroch. Na. (2⁰/₀ig) + 0,05 ccm Blutkörperchen + 2 ccm
Salzlösung.

4^h25' bis 27' Zusatz des tauroch. Na in Reihen-
folge SO₄, Cl, Br, NO₃, J

4^h29' SO₄ > J > Cl, Br, NO₃

4^h31' SO₄ > J > Cl, Br, NO₃

4^h37' SO₄ > J > Cl > Br, NO₃

4^h48' SO₄ > J > Cl > NO₃ > Br.

Auch die Verhältnisse bei den Anionenwirkungen erinnern also an die mannigfachen Abstufungen der relativen Ionenwirksamkeiten, denen man bei den organischen hydrophilen Kolloiden begegnet, wenn man durch H⁺ oder OH⁻ deren elektrische Eigenschaften ändert.

Schluß.

Man darf nach all dem wohl in den Ergebnissen dieser neuen Hämolyseversuche eine Bestätigung der Annahme erblicken, daß die Salze die Hämolyse beeinflussen, indem sie auf die Kolloide der Blutkörperchen wirken. Im einzelnen wird man freilich den Versuchen schwerlich eine klare Deutung geben können; denn falls man an Ladungseinflüsse von seiten der verwendeten Cytolytica denkt, wird man ja damit zu rechnen haben, daß in den Zellen Gemische verschiedener Kolloide vorliegen, die verschieden beeinflußt werden können; zudem ist

bekannt, daß Saponin, Sapotoxin, Kobragift besonders mit den Lipoiden reagieren, während taurocholsaures Natrium nach den Untersuchungen von Neufeld und Händel¹⁾ auch die Eiweißkörper angreift. Hinzukommen die von Tierart zu Tierart auch wechselnden quantitativen Relationen zwischen den einzelnen Zellkolloiden²⁾. Verschiedene Versuche, die Einzelergebnisse weiter aufzuklären, wie Beobachtungen der Kataphorese der Blutkörperchen während ihrer Hämolyse, Prüfung der Fällbarkeit der einzelnen Cytolytica durch die Salze, Einfluß der Cytolytica auf die Oberflächenspannung der Lösungen, haben denn auch zu keinen nennenswerten Resultaten geführt. Das Hauptergebnis unserer Versuche scheint uns zu sein, daß in den kombinierten Hämolysen mit Saponin und Sapotoxin die Beziehung zu den Binnenelektrolyten der verschiedenen Blutkörperchen klar zum Ausdruck kommt, so daß wir in diesem Resultat eine Stütze der Ansicht erblicken, daß die Binnenelektrolyte in der Tat die Funktion der Konservierung einer bestimmten normalen Protoplasmakonsistenz ausüben. Vielleicht darf man daher von jetzt ab in Fällen einer pathologisch veränderten Blutkörperchenresistenz als Erklärung eine abnorme Salzmischung in den entarteten Blutkörperchen in den Bereich der Möglichkeit ziehen und kann eventuell, ohne gleich auf die mühsamen Aschenanalysen zu rekurieren, zuerst mit Hilfe der hier probierten kombinierten Saponin-Salzhämolysen nach einem gewissen Aufschluß suchen.

¹⁾ Neufeld und Händel, Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt 28, 572, 1908.

²⁾ Siehe u. a. A. Mayer und Schaeffer, Compt. rend. de l'Acad. 155, 728, 1912.

Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen.

II. Kataphorese und Hämolyse.

Von

Shuzo Kozawa.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 27. Januar 1914.)

Durch die Versuche, die auf den folgenden Seiten beschrieben sind, wurde die Frage geprüft, ob die Größe der elektrischen Gesamtladung, welche die roten Blutkörperchen führen, und der zufolge sie z. B. in einem elektrischen Potentialgefälle in Bewegung geraten, von Tierart zu Tierart differiert, und ob, wenn dies der Fall ist, der Ladungsgröße andere Eigenschaften der Blutkörperchen, vor allem ihre Hämolysierbarkeit, symbat sind. Es ist nämlich in der vorausgehenden Arbeit von Höber und Nast¹⁾ gezeigt worden, daß die Resistenz der Blutkörperchen, die von Art zu Art verschieden groß ist, unter anderem von den Binnenelektrolyten der Blutkörperchen abhängt, die gleichfalls artspezifisch gemischt sind, und daß dieser Zusammenhang wahrscheinlich so zu denken ist, daß die Elektrolyte auf die Zellkolloide wirken und diesen eine gewisse Konsistenz verleihen. Nun ist dieser Einfluß der Elektrolyte auf die Kolloide sicherlich zum Teil elektrischer Natur; auch dafür werden in der voranstehenden Arbeit einige Anhaltspunkte gegeben. So ergab sich die genannte Fragestellung, und auf Anregung und unter Leitung von Prof. Höber wurde sie einer Prüfung unterzogen.

Auf die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen Hämolyse und elektrischer Ladung der Blutkörperchensubstanz ist

¹⁾ Höber und Nast, diese Zeitschr. 60, 131, 1914.

schon einmal durch L. Michaelis und D. Takahashi¹⁾ hingewiesen worden. Diese bestimmten nämlich erstens, bei welcher Wasserstoffionenkonzentration Blutkörperchen, die in Gemischen von Natriumacetat und Essigsäure suspendiert sind, das Hämoglobin austreten lassen, und fanden für die Blutkörperchen von Hammel, Pferd, Taube und Maus die gleiche Grenzkonzentration von etwa $1 \cdot 10^{-5}$ $[H^+]$. Zweitens bestimmten sie den isoelektrischen Punkt der Blutkörperchenstromata; zu diesem Zweck lösten sie die Blutkörperchen mit destilliertem Wasser auf und setzten die Essigsäure-Acetatgemische hinzu. Alsdann fällt von einer bestimmten minimalen Wasserstoffionenkonzentration ab ein farbloser Niederschlag aus, dieser verstärkt sich zunächst mit wachsendem H^+ -Gehalt der Mischung, wird dann wieder schwächer und nimmt dann abermals zu, indem er sich mehr und mehr durch zersetztes Hämoglobin rotbraun färbt. In dem ersten Fällungsmaximum erblickten Michaelis und Takahashi den Ausdruck des isoelektrischen Verhaltens der Stromata; die zugehörige Wasserstoffionenkonzentration liegt für alle untersuchten Blutkörperchen, d. h. für die Blutkörperchen von Hammel, Schwein, Rind, Kaninchen, Maus und Taube wiederum bei dem gleichen Wert $[H^+] = 1 \cdot 10^{-5}$. Danach käme man zu dem Schluß, daß Hämolyse eintritt, wenn die Stromasubstanz isoelektrisch gemacht wird; artspezifische Differenzen gäbe es hierbei aber nicht.

Mit diesem Ergebnis stehen Angaben von Landsteiner²⁾ in gewissem Widerspruch. Auch dieser bestimmte die Ausflockbarkeit der Blutkörperchenstromata verschiedener Tiere durch Wasserstoffionen, aber mit etwas anderer Methode. Das Blut wurde nach Sachs³⁾ durch Wärme lackfarben gemacht, aus dem verdünnten Blut wurden dann die Stromata ausgeschleudert, in 1% Kochsalz suspendiert und dann in Acetat-Essigsäuregemische eingetragen. Es ergab sich, daß die Stromata der einzelnen Tierarten in ihrer Fällbarkeit recht erheblich differieren; ordnet man sie nach dem Beginn der Ausflockung, so erhält man, mit der am leichtesten ausflockenden Art be-

¹⁾ Michaelis und Takahashi, diese Zeitschr. 29, 439, 1910.

²⁾ Landsteiner, diese Zeitschr. 50, 176, 1913.

³⁾ H. Sachs nach Handb. der Technik und Methodik der Immunitätsforschung von Kraus und Levaditi I, 1908.

ginnend, folgende Reihe: Taube > Ratte, Kaninchen > Meerschweinchen, Katze > Pferd, Gans > Mensch > Huhn, Hammel, Ziege > Rind.

Ich selbst bestimmte die elektrische Ladung der Blutkörperchenbestandteile auf andere, direktere Weise, nämlich durch Kataphorese der intakten Blutkörperchen. Wie Höber¹⁾ nämlich gezeigt hat, wandern normale Blutkörperchen im elektrischen Potentialgefälle zur Anode und können durch ausreichenden Zusatz von Wasserstoffionen oder von mehrwertigen Kationen umgeladen werden, so daß sie zur Kathode wandern. Artdifferenzen in der Aufladung der Blutkörperchen konnten danach so aufgesucht werden, daß für jede Körperchenart diejenige Konzentration eines der wirksamen Ionen bestimmt wurde, welche die Blutkörperchen eben isoelektrisch macht. Sitz und Natur der Ladung sind bei dieser Art Messung zwar am allerwenigsten definiert; denn nicht bloß die verschiedenen Kolloide des Stromas und des Zell-„Inhalts“ beteiligen sich an der Gesamtladung, sondern dazu kommen noch die Ladungen durch freie Ionen infolge relativ beschränkter Permeabilität der Grenzfläche von Zelle und Umgebung. Dafür bietet die kataphoretische Methode aber den Vorteil, daß man mit der intakten Zelle arbeiten kann.

Zur Bestimmung der Kataphoreserichtung verwendete ich den von Höber angegebenen Apparat und hielt mich bei der Handhabung ganz an die vorhandenen Vorschriften. Als umladende Ionen wurden H^+ - und La^{+++} -Ionen benutzt. Um den Einfluß der H-Ionen nach Möglichkeit auf die Zelloberfläche zu beschränken, verwendete ich nicht Acetat-Essigsäuregemische, sondern Gemische von Phosphorsäure und primärem Phosphat. Da nach den Angaben von Overton u. a. viele organische Säuren, z. B. die Fettsäuren, in lebende Zellen eindringen, während anorganische Säuren dies zunächst nicht tun, erschien es wahrscheinlich, daß sich durch die Benutzung der Phosphorsäure-Phosphatgemische der Ort der Ladungsänderung beschränken und dadurch die Übersicht über die Folgen vereinfachen ließe. Für die Richtigkeit dieser Überlegung lassen sich vielleicht einige Versuche von D. Dale²⁾ anführen. Diese

¹⁾ Höber, Arch. f. d. ges. Physiol. 101, 627, 1904; 102, 196, 1904.

²⁾ Dale, Journ. of Physiol. 46, 129, 1913.

fand, daß die H-Ionenkonzentration, bei der Paramaecien innerhalb einer gewissen Zeit zugrunde gehen, je nach der Zusammensetzung des benutzten Puffergemisches verschieden groß ist, nämlich für:

Natriumacetat-Essigsäure . . .	[H ⁺] = 10 ^{-5,52}
Glykokoll-Salzsäure	[H ⁺] = 10 ^{-4,06}
Natriumcitrat-Citronensäure . .	[H ⁺] = 10 ^{-3,91}

Das Gemisch mit der relativ schwachen Fettsäure tötet also bei der geringsten H⁺-Konzentration, vielleicht weil seine H-Ionen nicht bloß die Plasmahaut, sondern von vornherein auch das Zellinnere angreifen.

Die gebrauchten Phosphatmischungen stellte ich folgendermaßen her: $\frac{1}{3}$ molekulare Lösungen von Phosphorsäure, von primärem und sekundärem Phosphat wurden so weit mit Wasser verdünnt, daß sie zu den Blutkörperchen ungefähr isotonisch waren; ihre Gefrierpunkterniedrigung betrug 0,549°. Mit diesen Lösungen wurden die in der folgenden Tabelle verzeichneten Gemische hergestellt, deren H⁺-Konzentration in der Gaskette gemessen wurde.

Primäres Phosphat	Phosphorsäure	[H ⁺]
49,5	0,5	10 ^{-3,795}
49,0	1,0	10 ^{-3,388}
48,0	2,0	10 ^{-3,181}
47,0	3,0	10 ^{-2,979}
46,0	4,0	10 ^{-2,770}
45,0	5,0	10 ^{-2,671}

Primäres Phosphat	Sekund. Phosphat	[H ⁺]
10,0	0,0	10 ^{-4,263}
9,9	0,1	10 ^{-4,588}
9,75	0,25	10 ^{-4,979}
9,5	0,5	10 ^{-5,261}
9,0	1,0	10 ^{-5,621}
8,0	2,0	10 ^{-6,072}

Zur Beeinflussung der Kataphorese mit La⁺⁺⁺ verwendete ich eine Stammlösung von ca. $\frac{1}{100}$ mol. La(NO₃)₃ in 0,95%igem NaCl, die in verschiedenem Maße mit 0,95%igem NaCl verdünnt wurde.

Kataphoreseversuche.

Bei diesen Versuchen wurde eine sehr kleine Menge abzentrifugierter Blutkörperchen in die verschiedenen Lösungen übertragen und sofort die Richtung der Kataphorese bestimmt.

1. Umladung durch Wasserstoffionen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Wasserstoff- ionen- exponent	Kaninchen	Meer- schweinchen	Pferd	Katze	Mensch	Hund	Ziege	Hammel	Rind	Schwein
4,263	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,795	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,388	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
3,131	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2,979	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
2,770	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,671	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2. Umladung durch Lanthanionen.

La ⁺⁺⁺ -Kon- zentration	Kaninchen	Meer- schweinchen	Pferd	Katze	Mensch	Hund	Ziege	Hammel	Rind	Schwein
$\frac{1}{\infty}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\frac{1}{3000}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\frac{1}{1000}$	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
$\frac{1}{500}$	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
$\frac{1}{333}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\frac{1}{250}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\frac{1}{200}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Die beiden Tabellen lehren übereinstimmend, daß art-spezifische Differenzen in der Größe der Gesamtladung der Blutkörperchen existieren. Die aus den Tabellen abzulesenden Konzentrationen, welche die Blutkörperchen isoelektrisch machen, sind einigermaßen exakt bestimmt, soweit die Methodik das zuläßt. Die Blutkörperchen in der Kataphoresekammer sedimentieren nämlich ziemlich rasch; sobald sie sich aber einmal auf den Boden der Kammer gelagert haben, sind sie natürlich unbeweglich geworden. Es ist deswegen notwendig, sehr rasch zu arbeiten. Tritt irgendeine

Verzögerung ein, so muß die Kammer frisch gefüllt werden; in der Zwischenzeit hat sich aber manchmal die Suspension, die zur Fällung dient, schon verändert, denn wir werden sehen, daß die Ladung von der Dauer der Wirkung der ladungsändernden Lösung abhängig ist. Für die Versuche spricht auf jeden Fall, daß die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen ungefähr übereinstimmen: in beiden Fällen, sowohl mit H^+ wie mit La^{+++} , werden die Blutkörperchen von Kaninchen und Meerschweinchen am leichtesten umgeladen, und die Blutkörperchen von Hammel, Rind und Schwein am wenigsten leicht. Auch mit Landsteiners Angaben über die verschiedene Fällbarkeit der Blutkörperchenstromata stimmt die hier gefundene Reihenfolge bemerkenswert überein:

Kataphorese(H^+): Kaninchen > Meerschweinchen > Pferd, Katze, Mensch > Hund > Ziege > Hammel > Rind, Schwein.

Kataphorese (La^{+++}): Kaninchen > Meerschweinchen > Pferd, Katze, Hund > Mensch, Ziege > Hammel, Rind, Schwein.

Stromafällung: Kaninchen > Meerschweinchen, Katze > Pferd > Mensch > Hammel, Ziege > Rind.

Um zu prüfen, ob die Übereinstimmung noch weiter geht, ergänzte ich noch die Messungen von Landsteiner durch die Prüfung der Fällbarkeit von Stromata des Schweins. Sie wurden, wie in den Versuchen von Landsteiner, nach der Methode von Sachs dargestellt und in Essigsäure-Acetatgemischen suspendiert. Der Vergleich mit den Stromata vom Rind ergab folgendes:

$10^6 H^+$	1,6	4,8	14	42	130	400	800
Rind	-	-	-	+	++	+++	+++
Schwein . .	-	-	+	++	+++	+++	+++

Die Stromata vom Schwein flocken danach etwas leichter aus als die vom Rind; aber die gefundenen Werte sind nicht ganz eindeutig, weil zum Unterschied von den Rinderstromata die Stromata vom Schwein trotz allen Waschens etwas rotbraun gefärbt blieben.

Mit den Ergebnissen von Michaelis und Takahashi stimmen unsere Ergebnisse nicht überein. Die Methoden sind ja freilich sehr verschieden.

Hämolyseversuche.

Zu diesen Versuchen verwendeten wir dreimal mit Kochsalzlösung gewaschene Blutkörperchen. In 10 ccm der Gemische von primärem und sekundärem Phosphat bzw. primärem Phosphat und Phosphorsäure wurde jedesmal 0,1 ccm Blutkörperchenbrei eingetragen und dann die Probe bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Einige Versuchsbeispiele mögen den Verlauf schildern:

Wasserstoffionen-exponent		3,388	3,795	4,263	4,588	4,979	5,261	5,621
Katze	3 Std.	++++	±	-	-	-	-	-
	6 " "	+++++	+++	+	+	-	-	-
	24 " "	+++++	+++++	++++	+++	++	±	-
Rind	3 " "	+++	-	-	-	-	-	-
	6 " "	+++++	+	-	-	-	-	-
	24 " "	+++++	++++	+	-	-	-	-
Schwein	3 " "	+	-	-	-	-	-	-
	6 " "	+++	-	-	-	-	-	-
	24 " "	+++++	+++	-	-	-	-	-

Wasserstoffionen-exponent		3,388	3,795	4,263	4,588	4,979	5,261	5,621
Katze	3 Std.	++++	±	-	-	-	-	-
	6 " "	+++++	+++	+	-	-	-	-
	24 " "	+++++	+++++	++++	++	±	-	-
Meerschweinchen	3 " "	+++++	+++	+	-	-	-	-
	6 " "	+++++	+++++	++	±	-	-	-
	24 " "	+++++	+++++	+++++	++++	+++	±	-
Kaninchen	3 " "	+++	-	-	-	-	-	-
	6 " "	+++++	++	+	-	-	-	-
	24 " "	+++++	++++	+++	++	++	±	-

Wasserstoffionen-exponent		3,388	3,795	4,263	4,588	4,979	5,261	5,621
Hammel	3 Std.	+++	-	-	-	-	-	-
	6 " "	+++++	-	-	-	-	-	-
	24 " "	+++++	++++	-	-	-	-	-
Rind	3 " "	+++	-	-	-	-	-	-
	6 " "	+++++	+	-	-	-	-	-
	24 " "	+++++	+++++	+	-	-	-	-
Schwein	3 " "	+	-	-	-	-	-	-
	6 " "	+++	-	-	-	-	-	-
	24 " "	+++++	+++	-	-	-	-	-

In dieser Art wurde eine große Zahl von Versuchen durchgeführt, die z. B. folgende Reihen ergaben:

1. Katze $>$ Rind, Hammel,
2. Rind \geq Pferd $>$ Schwein,
3. Hund = Ziege,
4. Rind $>$ Schwein,
5. Rind $>$ Hammel $>$ Schwein,
6. Ziege $>$ Rind $>$ Hammel, Pferd,
7. Katze $>$ Rind $>$ Schwein,
8. Meerschweinchen $>$ Kaninchen $>$ Rind,
9. Meerschweinchen $>$ Kaninchen = Katze
usw.

Daraus ließ sich die Gesamtreihe kombinieren:

Meerschweinchen $>$ Kaninchen, Katze $>$ Hund, Ziege $>$ Mensch, Rind, Pferd, Hammel $>$ Schwein.

Zeitlicher Einfluß der Wasserstoffionen auf die Kataphorese.

Vergleicht man, um zu prüfen, ob Kataphorese und Hämolyse zusammenhängen, die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen, so fällt es auf, daß zur Umladung viel größere Konzentrationen an H^+ verwendet werden mußten, als zur Hämolyse. Das ist aber nur Sache der Methodik. Umladung wie Hämolyse sind Vorgänge, die Zeit brauchen. Für die Hämolyse geht dies schon klar aus den angeführten Versuchsprotokollen hervor. Man erkennt den Zeiteinfluß darin, daß man mit einer größeren H^+ -Konzentration in 3 Stunden dasselbe erreicht, wie mit einer kleineren H^+ -Konzentration in 6 Stunden. Die Hämolysegeschwindigkeit ist also abhängig von der aktiven Masse der H -Ionen. Gerade so ist auch die Umladung ein Zeitvorgang. Darauf wurde als Fehlerquelle bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Blutkörperchen bereits (S. 150) aufmerksam gemacht. Hier sollen genauere Angaben darüber folgen.

In der nächsten Tabelle sind die Zeiten genannt, nach denen bei öfterer Prüfung zuerst das Vorhandensein positiver Ladung auf den in den verschiedenen Lösungen suspendierten Blutkörperchen bemerkt wurde:

Wasserstoffionen- exponent	Kanin- chen	Meer- schw.	Katze	Pferd	Ziege	Hammel	Rind	Schwein
3,795		5 ^h	5 ^h	24 ^h	24 ^h	24 ^h	∞	∞
3,388	> 0'	30'		4 ^h	5 ^h	5 ^h	5 ^h	6 ^h
3,131	> 0'		> 0'	> 0'	2 ^h	2 ^h	(schwach) 2 ^h	2 ^h 15'
2,979					1 ^h	1 ^h 15'	(schwach) 1 ^h	1 ^h 30'

Stellt man hiernach noch einmal eine Reihe der Umladbarkeit auf, so gelangt man zu der Anordnung:

Kaninchen > Meerschweinchen > Katze > Pferd > Ziege > Hammel > Rind > Schwein.

Die Reihe stimmt im wesentlichen mit den vorher erhaltenen überein.

Zusammenhang von Hämolyse und Kataphorese.

Vergleicht man nun die für Hämolyse und Kataphorese gültig gefundenen Reihen, so ist ein gewisser Parallelismus unverkennbar. Stellen wir nochmals die Ergebnisse einander gegenüber:

Rasche Umladung durch H⁺:

Kaninchen > Meerschweinchen > Pferd, Katze, Mensch > Hund > Ziege > Hammel > Rind, Schwein.

Allmähliche Umladung durch H⁺:

Kaninchen > Meerschweinchen > Katze > Pferd > Ziege > Hammel > Rind > Schwein.

Hämolyse durch H⁺:

Meerschweinchen > Kaninchen, Katze > Hund, Ziege > Mensch, Rind, Pferd, Hammel > Schwein.

Am Anfang der drei Reihen stehen also Kaninchen, Meerschweinchen und Katze, am Ende Hammel und Rind, dann Schwein. Die Ordnung der verschiedenen Zwischenglieder ist freilich unregelmäßig, namentlich die Stellung für Pferd und Mensch inkongruent. Trotzdem gibt die Übereinstimmung der Endglieder den Reihen ein ähnliches Gepräge.

Es wird dadurch die Vermutung nahegelegt, daß Hämolyse und Ladung in ursächlichem Zusammenhang stehen, und im speziellen wird man die Deutung des Zusammenhangs in der

schon von Michaelis und Takahashi angegebenen Richtung suchen, daß die Hämolyse als Folge eines Zusammenflockens von Zell-, speziell Plasmahautkolloiden im isoelektrischen Punkt aufzufassen ist. Michaelis und Takahashi sind zu der Ansicht freilich durch Versuche gekommen, die mit meinen Ergebnissen durchaus nicht übereinstimmen. Denn weder finde ich, daß die Hämolysierbarkeit durch die aktiven Ionen, noch daß die Veränderlichkeit des Sinnes der elektrischen Aufladung der Blutkörperchen von Tierart zu Tierart die gleiche ist.

Die eben genannte Vermutung wäre nun genauer zu prüfen, d. h. es müßte nachgesehen werden, ob die Blutkörperchen wirklich im isoelektrischen Punkt maximale Instabilität besitzen. In dieser Hinsicht ließ sich folgendes konstatieren:

Bei meinen zahlreichen Versuchen habe ich niemals gefunden, daß Blutkörperchen, die der Wirkung von H-Ionen ausgesetzt wurden, längere Zeit positiv geladen sein konnten, ohne sich aufzulösen. Die Hämolyse begann meistens schon, wenn noch negativ geladene Blutkörperchen unter dem Mikroskop in der Kataphoresekammer zu sehen waren, so daß man auf nichts weiter schließen kann, als daß bei Annäherung an den isoelektrischen Punkt durch Zusatz von H^+ die Hämolyse einsetzt. Von einer Maximumwirkung war nichts zu bemerken.

Anders bei den Versuchen mit La-Ionen! Es ist leicht zu konstatieren, daß Blutkörperchen selbst 24 Stunden in vollkommener Weise ihr normales Aussehen behalten können, auch wenn sie durch La^{+++} umgeladen sind. Das hat nichts mit der Agglutination zu tun, die bei Zusatz der La-Ionen zustande kommt. Denn durch öfteres, kräftiges Umschütteln kann man es leicht erreichen, daß die Blutkörperchen nicht zusammenklumpen. Umladung durch La^{+++} bewirkt also nicht Hämolyse.

Wohl aber ließ sich feststellen, daß bei mittlerer La^{+++} -Konzentration kräftige Hämolyse einsetzt, während zu gleicher Zeit in den Gemischen mit kleinen und mit großen La^{+++} -Gehalten die Hämolyse gleich Null oder fast gleich Null ist. Bei Schweineblutkörperchen wurde z. B. konstatiert, daß nach einstündiger Wirkungsdauer in Lösungen mit ca. $\frac{1}{250}$ bis $\frac{1}{500}$ mol. $La(NO_3)_3$ reichlich Hämolyse eingetreten war, während in Lösungen mit ca. $\frac{1}{1000}$ und mit ca. $\frac{1}{200}$ bis $\frac{1}{170}$ mol. die

Hämolyse nur schwach war. Ich kann nicht behaupten, daß die Blutkörperchen genau im isoelektrischen Punkt am instabilsten sind, aber nach diesen eben genannten Versuchen ist der Zusammenhang zwischen Hämolyse und isoelektrischem Verhalten doch recht wahrscheinlich geworden.

Warum bei der H^+ -Wirkung die Hämolyse so viel leichter zustande kommt, als bei der La^{+++} -Wirkung, ist schwer zu sagen. Es könnte wohl damit zusammenhängen, daß die H-Ionen zum Teil in anderer Weise auf die Eiweißkörper einwirken als die La-Ionen. Die Eiweißkörper verhalten sich ja nicht bloß wie Suspensionskolloide, sondern auch wie hydrophile Kolloide, die den echt gelösten Stoffen nahestehen, und speziell wie Ampholyte. Die Ampholytnatur schließt ja aber einen besonderen Einfluß der H- (bzw. OH-) Ionen auf die Löslichkeit in sich. Soweit also der Ampholytcharakter der Eiweißkörper bei der Hämolyse in Frage kommt, inkludiert er eine Empfindlichkeit gegen H^+ , dagegen nicht gegen La^{+++} .

Da meines Wissens nichts bisher darüber bekannt ist, ob Eiweißkörper bei einer ganz bestimmten Konzentration an dreiwertigen Kationen maximal ausflocken, so habe ich dies untersucht. Eine 0,25%ige Lösung von Casein in 0,33 norm. Natriumacetat wurde aufs Zehnfache mit verschiedenen konzentrierten Lösungen von Lanthannitrat verdünnt. Das Ergebnis war das folgende:

La-Konz.	m/100	m/200	m/333	m/400	m/500	m/625	m/1000	m/1250	m/2500	m/5000	m/10000	m/20000	m/50000
nach ca. 1 Std.	—	—	—	—	—	+	++	+	—	—	—	—	—
" " 1 1/2 "	—	—	—	—	—	+	+++	+++	++	+	—	—	—
" " 2 "	—	—	—	—	±	++	+++	+++	++	++	++	++	—

Durch dieses Ergebnis erhält der Versuch, die Hämolyse in der genannten Art auf Ausflockung von Zellkolloiden im isoelektrischen Punkt zurückzuführen, eine weitere Rechtfertigung.

Schluß.

Die hier mitgeteilten Experimente wurden ursprünglich in der Absicht unternommen, die in der vorangehenden Veröffentlichung von Höber und Nast beschriebenen Hämolysen weiter aufzuklären. Es wurde dort gezeigt, daß die artspezifisch

verschiedene Hämolsierbarkeit bei der gleichzeitigen Einwirkung von Saponin oder Sapotoxin und von neutralen Alkalisalzen auf Blutkörperchen wahrscheinlich von der verschiedenen Salzmischung im Innern der Blutkörperchen abhängt, und es wurde die Vermutung ausgesprochen, daß die Binnenelektrolyte den Zellkolloiden vielleicht eine ganz bestimmte elektrische Ladung erteilen, deren Änderung durch die kolloiden Haemolytica Saponin und Sapotoxin die unmittelbare Ursache der Hämolyse darstellte. Wäre diese Vorstellung ausreichend, so hätte bei den hier beschriebenen Versuchen die gleiche Reihenfolge in der Hämolsierbarkeit von Tier zu Tier gefunden werden müssen, wie dort. Das ist jedoch durchaus nicht der Fall, und es ist auch begreiflich, daß es nicht der Fall ist. Denn bei Gelen von hydrophylen Kolloiden, denen wir die Blutkörperchen wohl bis zu einem gewissen Grade an die Seite stellen können, sind ja die mechanischen Eigenschaften auch keineswegs bloß eine Funktion der Ladung der auf sie einwirkenden Elektrolyte. Die hier festgestellten artspezifischen Unterschiede in der Größe der Gesamtladung sind also nur neben anderen Momenten für die Resistenz der Blutkörperchen von Bedeutung.

Zusammenfassung.

1. Die Untersuchung der Kataphorese von Blutkörperchen verschiedener Tierarten, die in Phosphorsäure-Phosphatmischungen suspendiert sind, lehrt, daß diejenige Wasserstoffionenkonzentration, bei der Bewegung weder zur Anode noch zur Kathode zustande kommt, eine von Art zu Art verschiedene ist. Die Blutkörperchen von Kaninchen und Meerschweinchen werden durch die geringsten, die Blutkörperchen von Hammel, Rind und Schwein durch die größten Wasserstoffionenkonzentrationen entladen, die Blutkörperchen von Katze, Pferd, Mensch, Ziege, Hund nehmen eine Mittelstellung ein.

2. Ungefähr die gleichen Artdifferenzen findet man, wenn man die Entladung der Blutkörperchen durch Lanthanionen vornimmt.

3. Auch die Hämolyse in Phosphatgemischen erfolgt bei artspezifisch verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen, und

die Reihenfolge der Tiere bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber den hämolytischen Eigenschaften der Ionen ist ungefähr die gleiche, wie ihre Empfindlichkeit gegen deren umladende Eigenschaften.

4. Es gibt gewisse mittlere Lanthankonzentrationen, bei denen die Blutkörperchen am leichtesten hämolysieren, während geringere und größere Konzentrationen weniger schädlich sind. Ebenso gibt es mittlere Lanthankonzentrationen, bei welchen Eiweißkörper maximal ausflocken.

5. Es liegt nach all dem nahe, die Hämolysen als Folge des Ausflockens der Zellkolloide im isoelektrischen Punkt aufzufassen.

Zum Schluß sei es mir gestattet, Herrn Professor Dr. Bethe für die gastliche Aufnahme in seinem Institut, sowie Herrn Professor Dr. Höber für die Anregung und stete Unterstützung bei der Arbeit meinen besten Dank auszusprechen.

Über die Bildung des Glykokolls aus Oxalsäure.

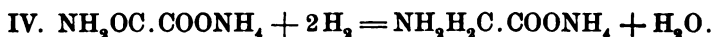
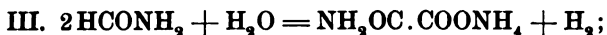
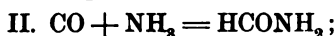
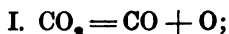
Von

Walther Löb.

(Aus der biochemischen Abteilung des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 26. Januar 1914.)

Vor einiger Zeit¹⁾ berichtete ich über die Bildung von Glykokoll aus Kohlensäure, Wasser und Ammoniak unter dem Einfluß der stillen Entladung. Das Formamid, das selbst direkt aus Kohlenoxyd und Ammoniak durch die Wirkung der Entladung entsteht, liefert über das oxaminsaure Ammonium durch Reduktion unter Mitwirkung des Wassers das Glykokoll. Die Reaktionsfolge wird durch folgende Gleichungen veranschaulicht:



Es war zur Zeit der Veröffentlichung jener Arbeit gelungen, das Vorhandensein einer Aminosäure einwandfrei festzustellen und durch die Eigenschaften ihrer Naphthalinsulfoverbindung, Krystallform und Schmelzpunkt nahezu jeden Zweifel auszuschließen, daß es sich um Naphthalinsulfoglycin handelte. Zur Analyse reichte die Substanzmenge noch nicht aus. Nach Durchführung langwährender Versuche in der geschilderten Anordnung ist es nunmehr gelungen, genügendes Material für eine Stickstoffbestimmung zu beschaffen. An der zweimal aus Wasser umkrystallisierten Substanz wurde durch die Analyse die Zusammensetzung der Verbindung bestätigt.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**, 684, 1913.

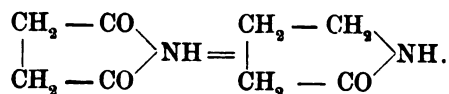
Angewandte Substanz: 0,0918 g.

Verbrauch an $n_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4 = 3,5 \text{ ccm} = 0,0049 \text{ g N} = 5,33\%$.

Berechnet: 5,28%.

Eine Mischung der Substanz mit besonders hergestelltem Naphthalinsulfoglycin bewirkte keinen Einfluß auf den Schmelzpunkt des letzteren.

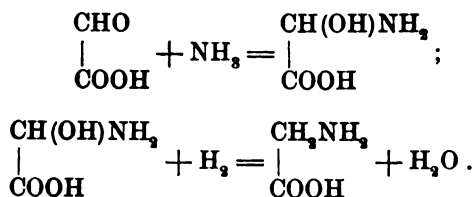
Die Entladungsreaktionen liefern, abgesehen von den gasförmigen Produkten, meist sehr schlechte Ausbeuten. Wenn dieselben bei der Glykokollsynthese auch die Sicherheit der Resultate nicht berühren, so erschien es mir doch wünschenswert, eine Bestätigung auf andere Weise zu erhalten. Die Bildung und der Nachweis der Oxaminsäure aus dem wasserhaltigen Formamid und des Oxamids aus dem wasserfreien Formamid ist so eindeutig, daß hier eine weitere Stütze durch rein chemische Reaktionen, die zwar an und für sich genügendes Interesse bieten, aber in den bekannten Oxydationen der Ameisensäure zu Oxalsäure in gewissem Sinne schon vorliegen, nicht erforderlich erschien. Jedoch steht die direkte Reduktion der Oxaminsäure zu Glykokoll als vereinzelt Tatsache da. Zwar ist es schon gelungen, ein Säureamid, wie z. B. das Acetamid zum Amin zu reduzieren, aber nur in wasserfreiem Lösungsmittel. Bei der Reduktion eines Säureamids vom Typus der Oxaminsäure erscheint a priori eine Abspaltung von Ammoniak und eine vielleicht folgende Reduktion der Carboxylgruppe wahrscheinlicher. Weniger merkwürdig ist die Tatsache, daß nur eine Seite des Moleküls, und zwar die mit der Amidgruppe verbundene, reduziert wird. Durch die Untersuchungen von Tafel und seinen Mitarbeitern über die elektrische Reduktion schwer reduzierbarer Substanzen wissen wir, daß in Verbindungen mit symmetrisch verteilten Carbonylgruppen meist nur eine reduziert wird. So entsteht z. B. aus dem Succinimid das Pyrrolidon:



Bei meinen ersten chemischen Versuchen, sowohl in wasserfreien Medien, wie auch in saurer und alkalischer Lösung gelang es mir nicht, Oxaminsäure zu Glykokoll zu reduzieren.

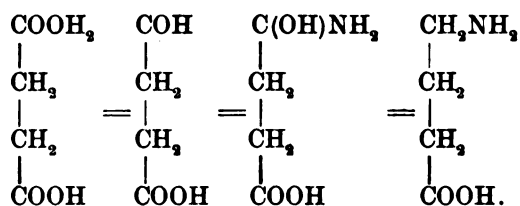
Als aber die Reduktion elektrolytisch in schwefelsaurer Lösung an Kathoden mit hoher Überspannung ausgeführt wurde, konnte mit voller Sicherheit die Bildung von Glykokoll nachgewiesen werden. Dieser Vorgang war unter den gewählten Versuchsbedingungen zunächst überraschend. Denn die Säurekonzentrationsverhältnisse und auch die Temperatur waren solche, die zweifellos ungemein schnell eine Abspaltung der NH_2 -Gruppe veranlassen mußten, die in dem Glykokoll selbst erhalten geblieben ist. Um den Vorgang aufzuklären, lag es demnach nahe, direkt von der Oxalsäure auszugehen und durch Zusatz von Ammoniumsulfat die Verhältnisse sogleich herzustellen, die durch Verseifung der Oxaminsäure in schwefelsaurer Lösung entstehen mußten. In der Tat zeigte sich, daß in einer schwefelsauren Oxalsäurelösung in Gegenwart von Ammoniumsulfat durch geeignete elektrische Reduktion Glykokoll gebildet wird. Das Hauptprodukt der Reduktion ist Glyoxylsäure. Auch bei der bekannten Bildung der letzteren aus Oxalsäure verhalten sich die beiden Carboxylgruppen verschieden. Ist erst eine Gruppe reduziert, so wird das ganze Molekül gegen weitere Reduktion ungemein widerstandsfähig.

Für den chemischen Mechanismus der Glykokollbildung aus Oxalsäure ist die wahrscheinlichste Vorstellung die folgende: An der Kathode gelangen neben Wasserstoffionen die Ammoniumionen zur Entladung. Der Wasserstoff reduziert die Oxalsäure zur Glyoxylsäure, das Ammonium zerfällt in Ammoniak und Wasserstoff. Das Ammoniak tritt mit der Aldehydgruppe der Glyoxylsäure zur Oxyaminoessigsäure zusammen und diese wird nun weiter zu Glykokoll reduziert:



Wenn auch die Bildung der Aminoessigsäure unter den gewählten Bedingungen nur in geringem Umfange auftritt, so ist das Ergebnis doch als eine volle Bestätigung und Ergänzung der Entladungsreaktionen zu betrachten.

Es lag nahe, zu untersuchen, ob die Bildung von Aminosäuren aus Dicarbonsäuren in Gegenwart von Ammoniumsulfat eine allgemeine Reaktion ist. Ich prüfte Malonsäure und Bernsteinsäure. Das Resultat war insofern überraschend, als Malonsäure unter den für Oxalsäure brauchbaren Bedingungen keine nachweisbare Spur einer Aminosäure lieferte, während die Bernsteinsäure wenigstens insofern der Oxalsäure analog war, als sie unter ganz bestimmten, aber recht schwierig zu treffenden Bedingungen in sehr geringer Menge zu der entsprechenden Aminosäure, der γ -Aminobuttersäure, reduzierbar ist. Auch hier dürfte der Vorgang verlaufen, wie bei der Oxalsäure:



Schon hier möchte ich aber erwähnen, daß es mir für die Bernsteinsäure nicht gelang, die entscheidenden Bedingungen vollständig sicher festzulegen; bei mehreren Versuchen, anscheinend immer unter den gleichen Bedingungen, blieb die Aminosäurebildung aus, ohne daß es mir glückte, die Ursache für dieses Versagen zu finden.

Experimenteller Teil.

Die elektrische Reduktion der Oxal- und Bernsteinsäure in Gegenwart von Ammoniumsalzen zu den Aminosäuren gehört zu den empfindlichsten elektrolytischen Prozessen, die mir bis jetzt begegnet sind. Sie reiht sich den von Tafel¹⁾ und seinen Schülern studierten Reduktionen schwer reduzierbarer Körper an und erfordert die peinlichste Behandlung des Elektrodenmaterials. Nachdem durch eine Reihe von Vorversuchen festgestellt war, daß die gewünschte Reduktion nur in saurer Lösung an Elektroden mit hoher Überspannung erzielbar ist, wandte ich mich auf Grund der Tafelschen und eigener Erfahrungen sofort den Quecksilber- und Bleikathoden

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 2209, 1900.

zu. Die von Tafel beobachtete Wirkung der geringsten Spuren von bestimmten Verunreinigungen des Kathodenmaterials zeigte sich auch bei meinen Versuchen in überraschender Weise. Besonders vermögen kaum analytisch nachweisbare Mengen von Kupfer die Wirksamkeit der Elektroden völlig aufzuheben. Die durch die elektrolytische Gasentwicklung gegen die Klemmschrauben geführten sauren Nebel genügten oft, um eine Spur Kupfer in die Lösung zu bringen und die Reduktion zu verhindern. Auch Platin wirkt schädlich, so daß man zweckmäßig von der Verwendung von Platinanoden absieht, weil Spuren von Platin auch in den Kathodenraum gelangen können. Um Mißerfolge möglichst zu vermeiden, wurden deshalb reinste Blei- oder Quecksilberkathoden gewählt. Als Anode kam nur reinstes Blei zur Verwendung, das vor Beginn der Reduktion elektrolytisch mit einer Schicht Bleiperoxyd überzogen war. Die Bleikathoden wurden aus möglichst reinem Blei in Holzformen gegossen und nach der Tafelschen Vorschrift behandelt, nachdem vorher aus schwach salpetersaurer Lösung von reinstem Bleinitrat eine Schicht von schwammigem Blei elektrolytisch auf der Oberfläche niedergeschlagen worden war. Die Bleianoden aus oberflächlich peinlich gesäuberten reinen Bleiplatten oder gegossenen Bleizylindern wurden ebenso behandelt wie die Kathoden. Das Quecksilber wurde vor seiner Verwendung im Vakuum frisch destilliert. Bezüglich der geeigneten Stromzuführung sei auf die Tafelschen Vorschriften verwiesen.

Wenn es trotz aller dieser Vorsichtsmaßregeln nicht gelang, die von Tafel an den von ihm untersuchten Substanzen erreichten Ausbeuten zu erzielen, so kann das sowohl daran liegen, daß es mir trotz vieler Variationen der Kathodensäurekonzentration nicht gelang, die optimale zu finden (bereits durch geringe Konzentrationsschwankungen wird der elektrolytische Effekt maßgebend beeinflußt), ferner daran, daß meine Einrichtung nicht gestattete, die für schwer reduzierbare Körper günstigen, sehr hohen Stromkonzentrationen bzw. Stromdichten herzustellen, die Tafel außerordentlich gute Dienste geleistet haben; es mag aber auch daran liegen, daß die Natur der von mir untersuchten Kombinationen die ungünstige Verteilung der Reduktion bezüglich der Aminosäurebildung unabhängig von

den äußeren Bedingungen zwangsmäßig veranlaßte. Ich erwähne diese Möglichkeit deshalb, weil ich es nicht für ausgeschlossen halte, daß, wenn man den mir fernerliegenden präparativen Zweck zum Selbstzweck einer Untersuchung machen würde, vielleicht weit bessere Ausbeuten erzielen kann.

Dieselbe Sorgfalt, wie die Reinigung der Elektroden, erfordert die der porösen Toncylinder, welche die Kathodenlösung enthält. Die von der Berliner Porzellanmanufaktur hergestellten Zellen wurden zuerst durch mehrtägiges Einstellen in verdünnte Natronlauge von den in dieser löslichen Stoffen befreit, sodann wurde Wasser und weiter verdünnte Salzsäure längere Zeit durchgesogen, schließlich wieder destilliertes Wasser, bis die saure Reaktion vollständig verschwunden war. Sodann wurden die Cylinder, in Filtrierpapier eingewickelt, bei 100° getrocknet. Die Temperatur der Elektrolyse scheint von geringem Einfluß auf ihren Verlauf zu sein. Die Ausbeuten waren bei Kühlung mit kaltem Wasser fast die gleichen, wie ohne Kühlung, wobei die Temperatur etwa 50° betrug.

Als Stromquelle diente eine 110-Volt-Leituug; die Intensität wurde durch einen Glühlampenwiderstand geregelt. Das Maximum der verwendbaren Stromstärke war durch die 6-Ampère-Sicherungen in dem Leitungsnetz auf diesen Wert beschränkt.

Die vielfach ausgeführten Stromausbeutebestimmungen gebe ich hier nicht wieder, da sich natürlich nicht entscheiden läßt, welcher Anteil auf die primäre Reduktion der Carboxylgruppe zur Aldehydgruppe, welcher Anteil auf die weitere Reduktion der durch Einwirkung des Ammoniaks auf die Aldehydgruppe entstehenden Oxyaminosäure zur Aminosäure kommt.

Die allgemeine Versuchsanordnung war die übliche. Die Anodenlösung, verdünnte Schwefelsäure von gleicher Konzentration, wie die der Kathodenlösung, wurde in ein weiteres, starkwandiges Becherglas eingefüllt und darauf geachtet, daß die Schwefelsäure im Tonzylinder und im Außengefäß gleiches Niveau besaß. Die Anode, meist ein, wie geschildert, vorbehandeltes Bleiblech von 5 cm Breite und 20 cm Länge, wurde in das äußere Gefäß gestellt und außerhalb des Glases im

spitzen Winkel nach unten gebogen, so daß von der unten angebrachten Klemmschraube keine Verunreinigung in den Elektrolyten gelangen konnte. Auf den Boden des Tonzylinders wurde entweder eine Schicht reinen Quecksilbers gebracht, in das ein in Glas eingeschmolzener Platindraht zur Stromzuführung eintauchte, so daß der Platindraht nicht mit dem Elektrolyten in Berührung kam, oder es wurde ein durch einen durchbohrten Gummipfropfen getragener Bleizylinder, der fast bis zum Boden der Tonzelle reichte, benutzt. Nach jeder Elektrolyse mußte der Bleizylinder mit Sand abgerieben und die ganze Vorbehandlung wiederholt werden.

Die ersten Versuche stellte ich mit dem Oxaminsäure-äthylester, dem Oxamäthan, an.

A. Die elektrische Reduktion des Oxamäthans.

Während Oxamäthan in verdünnter schwefelsaurer Lösung an präparierter Bleikathode nur in geringem Umfang zu Glykokoll reduziert wird, gelingt diese Umwandlung, wenn man durch Zusatz von Ammoniumsulfat für einen Überschuß von Ammoniak an der Kathode sorgt, dabei aber in stets saurer Lösung reduziert. Es bewährt sich bei dieser Elektrolyse die Quecksilberkathode noch besser als die Bleikathode.

5 g Oxamäthan werden in 150 ccm Wasser unter Zusatz von 20 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung und 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure gelöst. Die Kathodenlösung kommt in ein starkwandiges Becherglas von 9 cm Durchmesser, auf dessen Boden die Kathode aus reinstem Quecksilber liegt. Schwefelsäure von derselben Konzentration bildet in einem Tonzylinder die Anodenlösung, in die die Bleisuperoxydanode eintaucht. Mit 1,8 Amp. wurden 25 Ampèrestunden elektrolysiert. Die vom Ammoniak vollständig befreite, neutralisierte Reaktionslösung zeigte sehr starke Naphthoresorcinreaktion (Glyoxylsäure), deutliche Ninhydrinreaktion und enthielt nach der Formoltitration 0,14 g Glykokoll. Dementsprechend war die Ausbeute an Naphthalinsulfoglycin, das sofort rein war und nach einmaligem Umkrystallisieren in den charakteristischen verzweigten Nadeln vom Schmelzpunkt 155° erhalten wurde.

In 50%iger Schwefelsäure gelingt die Reduktion auch ohne Zusatz von Ammoniumsulfat mittels der Bleikathode.

Nach einer 19stündigen Elektrolyse mit 2 Amp. wurden aus 5 g Oxamäthan, gelöst in 70 ccm 50%iger Schwefelsäure, 0,15 g Glykokoll erhalten.

B. Glykokoll aus Oxalsäure.

Die Erfahrungen, die Tafel und Friedrichs¹⁾ bei der Reduktion der Oxalsäure in schwefelsaurer Lösung an Blei- und Quecksilberkathoden gemacht haben, konnte ich bei meinen Versuchen verwerten und bestätigen. Die genannten Verfasser erhielten als ausschließliches Reduktionsprodukt die Glyoxylsäure, während frühere Untersuchungen²⁾ an anderem Kathodenmaterial nur die Bildung von Glykolsäure ergeben hatten. Auch beobachteten Tafel und Friedrichs schon, daß Malonsäure sich im Gegensatz zu Oxalsäure nicht reduzieren läßt, was mit meinen vergeblichen Versuchen, Malonsäure in Alanin überzuführen, übereinstimmt. Sie fanden freilich die Bernstein-säure ebensowenig reduzierbar. Nach meinen Ergebnissen ist sie zwar viel schwerer reduzierbar als Oxalsäure, aber sie verhält sich gegenüber der Reduktion nicht so absolut negativ wie die Malonsäure.

Die Einzelheiten mehrerer Versuche stelle ich tabellarisch zusammen. Es ist erforderlich, stets mit großen Stromüberschüssen zu arbeiten. Da es mir lediglich darauf ankam, die Möglichkeit der Glykokollbildung aufzuklären, so begnügte ich mich damit, durch einen besonderen Versuch nachzuweisen, daß man die Elektrolyse bis zum völligen Schwinden der Oxalsäure durchführen kann, und daß das Hauptprodukt Glyoxylsäure bildet. Die letztere läßt sich aus der neutralisierten Kathodenlösung leicht durch essigsäures Phenylhydrazin als Glyoxylsäurephenylhydrazon isolieren und identifizieren. Zur Trennung und Bestimmung des Glykokolls wurde in folgender, auch bei den Oxamäthanversuchen benutzten Weise verfahren. Die saure Kathodenflüssigkeit wurde mit einem Überschuß von Natronlauge destilliert, bis das Ammoniak quantitativ entfernt war. Nach dem Abkühlen und der genauen Neutralisation mit verdünnter Schwefelsäure ließ sich

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 3187, 1904.

²⁾ Vgl. Balbiano und Alessi, Gazz. chim. 1882, 190. — Avery und Dales, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**, 2237, 1899.

durch die Ninhydrinreaktion qualitativ und durch die Sörensensche Formoltitration ungefähr quantitativ das gebildete Glykokoll bestimmen. Die Ninhydrinprobe gibt meist einen blauvioletten Farbenton. Die geringe Intensität desselben wies bereits auf die durch die Titration bestätigte geringe Ausbeute hin. Ich verzichtete deshalb auf die Isolierung des Glykokolls und zog vor, dasselbe als Naphthalinsulfoglycin zu gewinnen. Beiläufig sei bemerkt, daß, um bei der Formoltitration bei den kleinen Werten, um die es sich hier handelt, einigermaßen zuverlässige Daten zu erhalten, die Kohlensäure sorgfältig entfernt werden muß. Die neutrale Reaktionslösung wurde sodann mit 10 ccm 1 n-Natronlauge und einer ätherischen Lösung von β -Naphthalinsulfochlorid versetzt und unter zweimaliger Erneuerung des Zusatzes der Natronlauge nach je $1\frac{1}{2}$ Stunden, im ganzen 6 Stunden, auf der Maschine geschüttelt. Die vom Äther befreite, alkalische Flüssigkeit gibt mit verdünnter Schwefelsäure meist nur eine leichte Trübung; sie wird zweimal ausgeäthert, der filtrierte Äther verdunstet, der Rückstand, der häufig noch geringe Mengen von Oxalsäure enthält, in möglichst wenig verdünntem Ammoniak gelöst. Die filtrierte und gekühlte Flüssigkeit gibt sodann nach dem Ansäuern meist sofort einen alsbald krystallinisch werdenden Niederschlag, der filtriert oder zentrifugiert und mit kaltem Wasser gewaschen bei der Krystallisation aus Wasser oder verdünntem Alkohol die charakteristischen meist büschel- oder sternförmig angeordneten Nadeln des Naphthalinsulfoglycins liefert. Die Substanz ist vollkommen rein. Sie schmilzt bei 153 bis 154° und gibt bei der Analyse richtige Werte.

Angewandte Substanz: 0,1402 g.

Gefunden: Verbrauch von 5,8 ccm $\frac{1}{10}$ -H₂SO₄ = 0,00812 g = 5,7% N.

Berechnet: 5,28% N.

Bei sorgfältigem Arbeiten entspricht die Ausbeute an Naphthalinsulfoglycin genau dem Ergebnis der Formoltitration und der Intensität der Ninhydrinreaktion, so daß man nach dem Ausfall derselben die Ausbeute an Naphthalinkörper gut abschätzen kann.

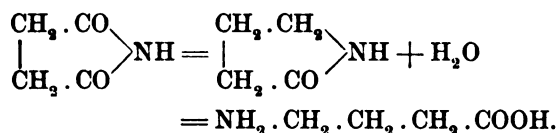
Tabelle I.

Nr.	Kathodenlösung	Kathode	Intensität Amp.	Ampère- stunden	Bemerkungen und Ergebnisse
1	5 g Oxalsäure 75 ccm 10%ige Schwefelsäure 25 ccm ges. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung	Hg 4,5 cm Durchmesser	1,90	14,0	Kühlung. Glykokoll: 0,037 g
2	5 g Ammoniumoxalat 210 ccm 10% H_2SO_4 15 ccm ges. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung	Hg 9 cm Durchmesser	1,25	10,4	Kühlung. Glykokoll: 0,148 g
3	5 g Ammoniumoxalat 75 ccm Wasser 20 ccm konz. H_2SO_4 15 ccm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Pb 5 × 10 cm	1,40	12,0	Kühlung. Glykokoll: 0,06 g
4	5 g Ammoniumoxalat 170 ccm Wasser 20 ccm konz. H_2SO_4 50 ccm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Hg 9 cm Durchmesser	1,50	23,0	Kühlung. Glykokoll: 0,03 g
5	5 g Ammoniumoxalat 40 ccm Wasser 40 ccm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 ccm konz. H_2SO_4	Hg 4,5 cm Durchmesser	4,00	72,8	Kühlung. Glykokoll: 0,0375 g
6	5 g Ammoniumoxalat 200 ccm Wasser 20 ccm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 ccm konz. H_2SO_4	Hg 9 cm Durchmesser	0,75	12,4	Ohne Kühlung. Glykokoll: 0,212 g
7	5 g Oxalsäure 70 ccm 10%ige Schwefelsäure 40 ccm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Pb Stab	3,50	47,2	Ohne Kühlung. Glykokoll: 0,049 g

Nach den bisherigen Ergebnissen würde daher die dem Versuch 6 entsprechende Vorschrift die geeignetste sein, um die Reduktion der Oxalsäure zu Glykokoll in Gegenwart von Ammoniumsalzen zu erreichen. Dabei muß ich aber erwähnen, daß die angegebene Ausbeute unter diesen Bedingungen die beste ist; bei einigen Versuchen ergab die Titration geringere Werte bis 0,06 g Glykokoll. Jedenfalls dürften eine reichliche Verdünnung der Schwefelsäure, die durch die Notwendigkeit, die Kathodenlösung nicht ammoniakalisch werden zu lassen, begrenzt ist, und geringe Stromdichte den Reduktionsprozeß in dem angestrebten Sinne begünstigen.

C. Das Verhalten der Bernsteinsäure.

Die für die Oxalsäure ausgeführten, allgemeinen Bemerkungen gelten auch hier. Nur ist die Reduktion der Bernsteinsäure um vieles subtiler als die der Oxalsäure, so daß ich wiederholt bei Wahl anscheinend genau identischer Bedingungen eine Reduktion nicht erreichte, während einigemal die Ausbeute an Aminobuttersäure relativ nicht ungünstig war. Es gelang mir nicht, wie schon erwähnt, bei den Fehlversuchen den störenden Faktor zu finden. Obgleich Tafel und Friedrichs die elektrische Reduktion der Bernsteinsäure nicht gelang, bieten doch die Arbeiten von Tafel und Stern¹⁾ insofern Beziehungen zu dem von mir untersuchten Problem, als sie von der Bernsteinsäure auf dem Umweg über das Succinimid, das sie der elektrischen Reduktion unterwarfen, zum Pyrrolidon gelangten, das beim Kochen mit Alkalien und Säuren unter Aufspaltung des Ringes in Aminobuttersäure übergeht:



Die Art der Bearbeitung der elektrolysierten Flüssigkeit war die gleiche wie bei der Oxalsäureelektrolyse. Der Eintritt einer Reduktion läßt sich unabhängig von der Bildung der Aminosäure an dem positiven Ausfall der Naphthoresorcinreaktion, die aber immer nur schwach auftritt, erkennen. Die Ninhydrinreaktion und die Formoltitration leisten auch hier zur Orientierung ausgezeichnete Dienste. Die Isolierung der Aminobuttersäure erfolgte in der Form der bisher in der Literatur noch nicht beschriebenen Naphthalinsulfoverbindung. Dieselbe krystallisiert ähnlich dem Naphthalinsulfoglycin in langen verzweigten Nadeln aus Wasser oder sehr verdünntem Alkohol und schmilzt bei 127 bis 128° (unkorrigiert).

Die Stickstoffverbindung ergab folgende Werte:

Angewandte Substanz: 0,0892 g.

Verbrauch: 2,9 ccm $\frac{1}{10}$ n-H₂SO₄ = 0,00406 g N = 4,55%.

Berechnet für C₄H₈O₃N · C₁₀H₇SO₂: N = 4,78%.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 2224, 1900.

Eine Übersicht über zwei Versuche gebe ich in der folgenden Tabelle II.

Tabelle II.

Nr.	Kathodenlösung	Kathode	Intensität Amp.	Ampère- stunden	Bemerkungen und Ergebnisse
1	5 g Bernsteinsäure 75 ccm Wasser 20 ccm konz. H_2SO_4 20 ccm $(NH_4)_2SO_4$	Pb-Kühl- rohr präp.	1,4	24,5	Kühlung. Aminobuttersäure: 0,107 g
2	5 g Bernsteinsäure 40 ccm Wasser 40 ccm $(NH_4)_2SO_4$ 20 ccm konz. H_2SO_4	Hg 4,5 cm Durchmesser	2,2	45,0	Ohne Kühlung. Aminobuttersäure: 0,0412 g

Zu den Versuchen ist zu bemerken, daß nur dann der positive Ausfall der Ninhydrinreaktion und das Resultat der Formoltitration verwertet wurden, wenn es gelang, die Naphthalinsulfoaminobuttersäure zu isolieren und umzukristallisieren. Weitere Versuche sollen vorläufig nicht angegeben werden. Zahlreiche Variationen in den Säurekonzentrationsverhältnissen und den Strombedingungen, auch die Wahl anderer Säuren, gaben ungünstige Resultate und meist keine Aminosäure.

Tafel konnte, wie bereits erwähnt, an der Bernsteinsäure im Gegensatz zur Oxalsäure überhaupt keine Reduktion erzielen. Mit Malonsäure verliefen auch meine Versuche, wie ich schon hervorhob, in Übereinstimmung mit Tafels Erfahrungen ganz negativ, und die Unsicherheit in meinen Resultaten an der Bernsteinsäure zeigt, daß hier ganz besondere Schwierigkeiten vorliegen. Jedoch beweisen die mehrfach erzielten positiven Ergebnisse, daß spezielle Bedingungen für die Reduktion der Bernsteinsäure zur Aminobuttersäure existieren und berechtigen auch zu der Hoffnung, daß trotz aller bisherigen Fehlversuche auch die Umwandlung der Malonsäure in β -Alanin gelingt.

Über die Bedeutung des Wassers bei den Prozessen der alkoholischen Gärung und der Atmung der Pflanzen.

Von

W. Palladin.

(Eingegangen am 29. Januar 1914.)

Ohne Wasser ist das Leben unmöglich. In trockenen Samen ist eine geringe Menge von Wasser enthalten. Das Keimen der Samen, d. h. der Übergang vom Stadium des latenten Lebens zum Stadium des aktiven Lebens ist von einer Aufnahme großer Wassermengen begleitet. Die in den Zellen während der Periode ihres aktiven Lebens enthaltene Wassermenge beträgt bis zu 90⁰/₀ und mehr. Die Zellen bedürfen für ihr aktives Leben nicht nur großer Mengen von Wasser, sondern es müssen auch die im Wasser gelösten Nährstoffe sich in schwacher Konzentration befinden. Aus diesem Grunde werden die Reservennährstoffe in der Gestalt von in Wasser unlöslichen Verbindungen in der Zelle abgelagert. Die Erhöhung der Konzentration des Zellsaftes ruft eine Abschwächung der in den Zellen vor sich gehenden Lebensprozesse hervor. So übt z. B. die Konzentration einer Lösung, in der Pflanzen kultiviert werden, eine äußerst starke Wirkung auf die Energie ihrer Atmung aus. Bei der Überführung in eine geringe Konzentration wird die Atmung rasch erhöht. Bei Überführung in stärkere Konzentration wird die Energie der Atmung herabgesetzt.

So schieden 100 g etiolierter Bohnenblätter in 6 Stunden nachstehende Mengen von Kohlensäure aus¹⁾:

¹⁾ W. Palladin und Komleff, *Revue générale de botanique* 1902.

Konzentration der Saccharose %	Dauer des Aufent- haltes in der betr. Konzentration	Menge der aus- geschiedenen Kohlensäure mg	Unterschied %
15	3 Tage	122,7	—
25	3 "	79,4	— 32,5
50	1 Tag	69,7	— 12,2
Wasser	1 "	154,0	+ 120,9

Starke Lösungen halten auch die Tätigkeit der in den Zellen enthaltenen Fermente auf, wie dies aus dem nachstehenden Versuche hervorgeht.

Versuch 1.

(Ausgeführt durch Herrn W. W. Zlotorowicz.)

3 Portionen zu je 3 g Hefanol, eine jede in 50 ccm Lösung.

1. Saccharose 50%, 2. Saccharose 30%, 3. Saccharose 10%.
Temperatur 16 bis 19⁰¹).

Dauer des Versuches	1. Saccharose 50%		2. Saccharose 30%		3. Saccharose 10%	
	Gesamt- menge der CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde	Gesamt- menge der CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde	Gesamt- menge der CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde
6 Std.	57,2	9,5	68,0	11,3	87,2	14,5
6 "	40,0	6,6	64,4	10,7	77,2	12,9
6 Std. 10 Min.	38,4	6,2	67,0	10,8	51,6	8,4
6 Std.	33,6	5,6	43,4	7,2	23,8	3,9
6 "	29,8	4,9	34,0	5,7	13,0	2,2
5 Std. 50 Min.	26,4	4,5	27,6	4,7	10,4	1,7
12 Std.	47,4	3,9	30,8	2,6	8,0	0,7
12 "	46,4	3,8	20,0	1,7	2,8	0,2
12 "	35,2	2,9	9,2	0,8	3,2	0,2
12 "	24,0	2,0	5,6	0,5	—	—
12 "	17,6	1,5	4,8	0,4	—	—
24 "	20,6	0,8	—	—	—	—
24 "	13,6	0,6	—	—	—	—
48 "	14,0	0,3	—	—	—	—
	444,2	—	374,8	—	277,2	—

Wie dies von Buchner²⁾ für den Preßsaft nachgewiesen wurde, bildet Hefanol bei starken Lösungen beträchtlich mehr

¹⁾ Die Kohlensäure wurde bei allen Versuchen mittels der Pettenkoferschen Röhren bestimmt. In die Gefäße mit den Fermenten wurde Toluol hinzugegan.

²⁾ E. Buchner, Die Zymasegärung. 1913. S. 150.

Kohlensäure als die schwachen, allein es arbeitet bei schwachen Lösungen die ersten Stunden über energischer als bei starken.

Die Beobachtungen der Physiologen betreffend die Bedeutung des Wassers für die physiologischen Prozesse befinden sich in vollständiger Übereinstimmung mit den Angaben der physikalischen Chemie über die Eigenschaften des Wassers. Erstens ruft das Wasser eine Dissoziation der Elektrolyte in Ionen hervor. Andere Flüssigkeiten besitzen diese Eigenschaft in viel geringerem Maße. Allerdings kommt gewissen Flüssigkeiten die gleiche (Formamid¹⁾ oder sogar noch eine stärkere (Cyanwasserstoffsäure²⁾ dissoziierende Tätigkeit zu als dem Wasser, allein man wird in dem gegebenen Falle auch noch mit den giftigen Eigenschaften der erwähnten Flüssigkeiten zu rechnen haben. Da mit der zunehmenden Verdünnung der wässrigen Lösungen der Elektrolyten der Grad ihrer Dissoziation in Ionen anwächst, die elektrolytische Leitfähigkeit zunimmt, und auch die chemische Aktivität eine höhere wird, so ist es leicht verständlich, weshalb die vitalen Prozesse nur in schwachen Lösungen energisch vor sich gehen.

Die Dielektrizitätskonstante des Wassers ist bedeutend größer als die Dielektrizitätskonstanten aller übrigen Flüssigkeiten. Nur Cyanwasserstoffsäure, Wasserstoffhyperoxyd und Formamid besitzen eine höhere Konstante als das Wasser. Auch diese hat eine wichtige physiologische Bedeutung, indem die Solventien mit den größten Dielektrizitätskonstanten im allgemeinen über die größte dissoziierende Tätigkeit verfügen³⁾. Endlich sind Stoffe nach Dutoit und Aston⁴⁾ nur dann leitfähig, wenn das Solvens polymerisiert ist. Von allen untersuchten Flüssigkeiten weist das Wasser den höchsten Grad von Polymerisation auf. Ein Molekül Wasser kann nach Ramsay und Shields⁵⁾ in Gestalt von $(H_2O)_4$ dargestellt sein. Brühl⁶⁾, der den Sauerstoff für ein vieratomiges Element ansieht, zählt aus diesem

¹⁾ P. Walden, Bull. Acad. Imp. Sc. St. Pétersbourg 1911, S. 1055.

²⁾ Centnerszwer, Zeitschr. f. physikal. Chem. 39, 217, 1902.

³⁾ Nernst, Zeitschr. f. physikal. Chem. 13, 531, 1894.

⁴⁾ Dutoit und Aston, Compt. rend. 125, 240, 1897.

⁵⁾ Ramsay und Shields, Zeitschr. f. physikal. Chem. 12, 433, 1893.

⁶⁾ Brühl, Zeitschr. f. physikal. Chem. 18, 514, 1895.

Grunde das Wasser zu den nicht gesättigten Verbindungen und erklärt durch diesen Umstand seine größere Befähigung zur Polymerisation, seine Dielektrizitätskonstante und seine hohe dissoziierende Fähigkeit. Bach¹⁾, der sich dieser Ansicht anschließt, vermutet, daß in der Zelle bei Anwesenheit von Ionen von H' und OH', sowie eines ungesättigten Moleküls $H_2 = O =$ deren Vereinigung zu labilen Komplexen $\begin{array}{c} H \\ \diagdown \\ O \\ \diagup \\ H \end{array}$ und $\begin{array}{c} HO' \\ \diagdown \\ O \\ \diagup \\ HO' \end{array}$ möglich ist.

Da nicht die Moleküle selbst, sondern deren Ionen eine chemische Aktivität besitzen, so wird es erklärlich, warum die Reaktionen zwischen Elektrolyten in wässrigen Lösungen sehr rasch verlaufen, die Reaktionen zwischen organischen Verbindungen dagegen beträchtlich langsamer. Für die Beschleunigung dieser Reaktionen sind Katalysatoren (in vitro) oder Fermente (in Organismen) erforderlich.

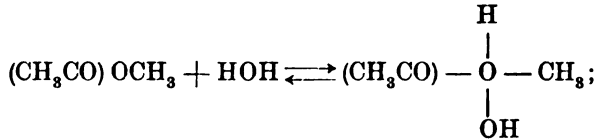
Obgleich viele organische Verbindungen zu den Nicht-elektrolyten gehören, so ist es doch vom physiologischen Gesichtspunkte aus betrachtet nicht gleichgültig, ob dieselben sich in Wasser lösen oder in irgendeiner anderen Flüssigkeit, da die Rolle des Wassers sich nicht auf seine Fähigkeit beschränkt, die Moleküle der in ihm aufgelösten Stoffe zu dissoziieren. So hat schon Bertollet (1803) die Behauptung aufgestellt, die Lösungen seien chemische Verbindungen. Mendelejew lieferte zahlreiche Beweise dafür, daß in Wasser gelöste Stoffe mit diesem Hydrate verschiedene Zusammensetzungen bilden. Diese Hydrattheorie wurde von Jones²⁾ und seinen Mitarbeitern weiter ausgearbeitet. Zu einer Hydratation sind sowohl Ionen wie auch ganze Moleküle befähigt. In verdünnten Lösungen äußert sich die Hydratation im stärksten Maße³⁾. Es ist möglich, daß hierin eine der Ursachen dafür enthalten ist, warum starke Saccharoselösungen nicht nur die Atmung lebender Pflanzen hemmen, sondern auch die Arbeit der Zymase, wie

¹⁾ A. Bach, diese Zeitschr. **31**, 443, 1911.

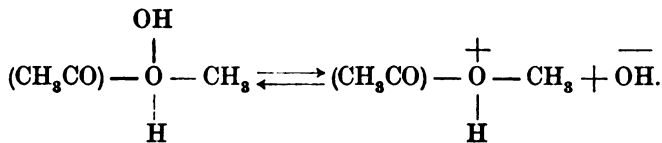
²⁾ H. Jones, The Elements of Physical Chemistry.

³⁾ Über die eigenartigen Anschauungen von H. E. Armstrong von der Rolle des Wassers in Lösungen siehe Proceed. of the Royal Society of London. Series A, **87**, 604, 1912.

dies aus den oben mitgeteilten Versuchen hervorgeht. Es ist auch sehr wahrscheinlich, daß bei der Hydratation Oxoniumverbindungen gebildet werden, d. h. solche mit vierwertigem¹⁾ Sauerstoff. So weist z. B. Stieglitz²⁾ nach, daß die Hydrolyse der Äther von den positiven Ionen des Äthers abhängig ist. Mit Wasser bildet der Äther anfangs eine Oxoniumbase:



dieselbe wird ionisiert:



Auch das Hydrat der Glucose³⁾ wird in Gestalt einer Oxoniumverbindung vorausgesetzt. Willstätter⁴⁾ hat nachgewiesen, daß das Anthocyan aus Kornblumen ebenfalls zu den Oxoniumverbindungen gehört. Es ist dies demnach der erste Nachweis einer Oxoniumverbindung in der Natur. Überhaupt sind gegenwärtig viele Fälle einer Bildung von Oxoniumverbindungen im Verlaufe von Reaktionen bekannt geworden.

Bei dem Ersatz des Wassers durch andere Lösungsmittel sind die gelösten Stoffe nicht nur nicht mehr imstande Hydrate zu bilden, sondern die Lösungsmittel gehen, auf Grund der in dieser Richtung namentlich von Walden und seinen Mitarbeitern angestellten Studien, die allerverschiedensten Verbindungen mit den gelösten Stoffen ein. So entstehen z. B. bei Lösungen in Formamid statt der Hydrate Amidate, und statt Hydrolyse tritt eine Amidolyse ein. Die Untersuchungen von

¹⁾ Oder mit dreiwertigem Sauerstoff. A. Werner, *Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der anorganischen Chemie*. 3. Aufl. 1913 S. 258.

²⁾ Stieglitz, *Americ. chem. Journal* **39**, 29 u. 166, 1908.

³⁾ F. Armstrong, *Die einfachen Zuckerarten und die Glucoside*. 1913.

⁴⁾ Willstätter, *Annal. d. Chem.* **401**, 188, 1913.

Bourquelot¹⁾ haben gezeigt, daß die organischen Lösungsmittel bei Gegenwart von Fermenten verschiedene Verbindungen mit den gelösten Stoffen eingehen können. So bildet die Glucose in Gegenwart von Emulsin verschiedenartige Glucoside mit ihnen. Versuche, das Wasser durch Lösungsmittel zu ersetzen, ergaben für die Hefenfermente nachstehende Resultate:

Versuch 2.

(Ausgeführt von D. A. Sabinin.)

3 Portionen Trockenhefe von Lebedew zu je 5 g mit 5 g Glucose. 1. 50 ccm Glycerin, 2. 50 ccm 50⁰/₀ige Lösung von Glycerin in Wasser, 3. 50 ccm 30⁰/₀ige Glycerinlösung. Während 48 Stunden wurden nachstehende Mengen Kohlensäure bei 16 bis 19⁰ ausgeschieden:

1. Reines Glycerin	2. 50 ⁰ / ₀ Glycerin	3. 30 ⁰ / ₀ Glycerin
0	133,0 mg	318,0 mg

Versuch 3.

(Ausgeführt von N. N. Monteverde.)

3 Portionen glykogenarmen Zymins zu je 6 g. 1. 100 ccm 15⁰/₀ige Saccharoselösung, 2. 75 ccm 15⁰/₀ Saccharose und 50 ccm Glycerin, 3. 50 ccm 15⁰/₀ Saccharose und 50 ccm Glycerin. Temperatur 17,5 bis 18⁰. Die erste Portion schied in 20 Stunden über 207 mg CO₂ aus (das Barytwasser in den Pettenkoferschen Röhren wurde völlig neutralisiert). Von der zweiten Portion wurden in 20 Stunden 157,3 mg CO₂ ausgeschieden. Die dritte Portion schied in 25¹/₂ Stunden nur 37,5 mg CO₂ aus. Die beiden soeben beschriebenen Versuche beweisen demnach die schädliche Wirkung großer Glycerinmengen auf die Arbeit der Zymase.

Versuch 4.

(Ausgeführt von W. W. Zlotowicz.)

3 Portionen zu je 6 g Zymin, 5 g Saccharose und 3 ccm Toluol. 1. 50 ccm 50⁰/₀iger (des Volumens) wässriger Lösung von Äthylenglykol, 2. 50 ccm 10⁰/₀ Äthylenglykol, 3. 50 ccm Wasser. Temperatur 16 bis 19⁰.

¹⁾ Bourquelot, La synthèse des Glucosides à l'aide de l'émulsine. Paris 1913. (Rev. scientif., Janvier 1913.)

Dauer der Versuche	50% Äthylenglykol	10% Äthylenglykol		Wasser	
	Gesamtmenge des CO ₂	Gesamtmenge des CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde	Gesamtmenge des CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde
6 Std.	15,8	128,2	20,5	150,0	25,0
8 "		136,8	45,6	159,0	53,0
12 Std. 45 Min.		394,0	30,7	410,3	32,4
3 Std.		97,2	32,4	81,2	27,1
3 Std. 10 Min.		107,2	33,8	76,2	24,0
20 " 15 "		516,3	25,5	303,3	15,0
4 " 45 "		70,8	14,9	32,8	6,9
4 Std.		58,8	14,7	23,8	7,2
24 "		216,8	9,0	77,2	3,2
24 "		76,8	3,2	2,0	0,1
24 "		8,4	0,3	—	—
		15,8	1806,3		1820,8

Versuch 5.

(Ausgeführt von W. W. Zlotorowicz.)

3 Portionen zu je 3 g Trockenhefe nach Lebedew, 5 g Saccharose und 3 ccm Toluol. 1. 50 ccm Wasser, 2. 45 ccm Wasser und 5 ccm Äthylenglykol, 3. 40 ccm Wasser und 10 ccm Äthylenglykol. Temperatur 16 bis 19°.

Dauer des Versuches	Saccharose 10%		Glykol 10% und Saccharose 10%		Glykol 20% und Saccharose 10%	
	Gesamtmenge des CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde	Gesamtmenge des CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde	Gesamtmenge des CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde
15 Std. 20 Min.	—	—	—	—	168,4	11,0
15 " 10 "	—	—	180,2	11,9	—	—
15 Std. "	192,0	12,8	—	—	—	—
8 "	96,4	12,0	106,8	13,3	84,0	10,5
25 "	170,0	6,8	186,6	7,4	195,4	7,8
24 "	131,6	5,5	135,8	5,6	148,8	6,2
72 Std.	590,0	—	609,4	—	596,6	—
48 Std.	119,6	2,5	—	—	170,2	3,5
48 "	20,8	0,4	—	—	86,0	1,5
24 "	2,0	0,1	—	—	23,2	1,0
192 Std.	732,4	—	—	—	876,0	—

Versuch 6.

(Ausgeführt von W. W. Zlotorowicz.)

3 Portionen zu je 3 g Zymin und 3 ccm Toluol. 1. 50 ccm Wasser, 2. 45 ccm Wasser und 5 ccm Äthylenglykol, 3. 40 ccm Wasser und 10 ccm Äthylenglykol. Temperatur 16 bis 19°.

Dauer des Versuches	Wasser		Glykol 10%		Glykol 20%	
	Gesamtmenge des CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde	Gesamtmenge des CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde	Gesamtmenge des CO ₂	CO ₂ in 1 Stunde
6 Std.	17,2	2,8	14,0	2,3	10,8	1,8
21 "	27,0	1,3	28,5	1,4	29,6	1,4
69 "	5,6	0,08	9,4	0,14	20,4	0,3
96 Std.	49,8	—	52,0	—	60,8	—

Wie aus den hier angeführten Versuchen (4, 5, 6) hervorgeht, hält das Äthylenglykol die alkoholische Gärung in starken Lösungen auf. Schwache Lösungen schwächen dieselbe während der ersten Stunden etwas ab, während die Gärung in den letzten Stunden energischer vor sich geht, und zwar wahrscheinlich infolge einer Hemmung in der Arbeit des proteolytischen Fermentes.

Versuch 7.

(Ausgeführt von H. J. Millak.)

2 Portionen zu je 3 g Hefanol, 3,75 g Saccharose und 0,0625 g K₂HPO₄. 1. 25 ccm Wasser, 2. 25 ccm 50%iger Formamidlösung. Temperatur 16 bis 19°. Von der Wasserportion wurden in 23 Stunden 206,4 mg CO₂ ausgeschieden, von der Formamidportion in 27 Stunden nur 3,6 mg CO₂.

Der Ersatz einer Hälfte der Wassermenge durch Formamid hat demnach eine völlige Hemmung der alkoholischen Gärung hervorgerufen.

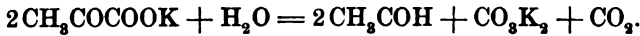
Versuch 8.

(Ausgeführt von N. N. Monteverde.)

4 Portionen zu je 6 g Zymin und 1 g durch KOH neutralisierte Brenztraubensäure. 1. und 2. je 100 ccm Glycerin, 3. 50 ccm Glycerin und 50 ccm Wasser, 4. 25 ccm Glycerin und 75 ccm Wasser. Temperatur 17 bis 19°.

1. Portion: Glycerin ohne Wasser		2. Portion: Glycerin ohne Wasser		Stunden	3. Portion: 50% Glycerin	4. Portion: 25% Glycerin
Stunden	CO ₂ mg	Stunden	CO ₂ mg		CO ₂ mg	CO ₂ mg
24	22,97	3	1,91	2	62,75	88,95
Hinzufügung von 10 ccm Wasser		Hinzufügung von 10 ccm Wasser		3	60,87	70,23
3	16,88	18	52,92	16	74,91	80,06
18 ¹ / ₂	28,58	6	18,29	6	26,71	30,45
		20	37,73	20	48,71	42,62
45 ¹ / ₂	68,43	47	106,85	47	273,95	312,31

Wie aus der nachstehenden Gleichung hervorgeht, ist Wasser erforderlich:



In der Tat wurde in der Glycerinlösung eine minimale Menge Kohlensäure ausgeschieden, und zwar im Verlaufe von 3 Stunden nur 1,9 mg, in dem 4. Versuche dagegen wurden im Verlaufe von 2 Stunden 88,9 mg CO₂ ausgeschieden. Auf die Carboxylase übt das Glycerin eine schädliche Wirkung aus; in Glycerin, dem nach 3 Stunden 10 ccm Wasser hinzugefügt worden waren, wurde bedeutend mehr Kohlensäure ausgeschieden als in dem Glycerin, dem das Wasser nach 24 Stunden hinzugefügt wurde. Das Hinzufügen von 25% Glycerin ruft nicht nur eine gewisse Verringerung der Kohlensäure hervor (ohne Glycerin 143,9), sondern auch eine Verlangsamung im Verlaufe der Spaltung der Brenztraubensäure, die mit Wasser rasch zu Ende geführt wird.

Versuch 9.

Mehreren Portionen zu je 3 g Hefanol wurde Glycerin in verschiedenen Konzentrationen beigemischt, sowie je ein paar Tropfen Methylenblaulösung. Die Gläser wurden, wie bei allen Versuchen mit Methylenblau, luftfrei verschlossen. Bei Wasser trat eine rasche Entfärbung des Methylenblaus ein. Bei Glycerin mit geringen Mengen Wasser war keine Entfärbung zu bemerken. Bei beträchtlichen Mengen Wassers trat die Entfärbung um so rascher ein, je größer das Quantum Wasser war.

Versuch 10.

Mehreren Portionen zu je 3 g Hefanol wurde Pyridin in verschiedenen Konzentrationen, sowie je ein paar Tropfen Methylenblaulösung beigemischt. Bei den Portionen ohne Wasser und bei solchen, wo das Pyridin mit nur geringen Mengen Wassers verdünnt war, wurde keine Entfärbung des Methylenblaus beobachtet. Bei Gegenwart von größeren Mengen Wassers verlief die Entfärbung um so rascher, je mehr Wasser zugegen war.

Glycerin und Pyridin¹⁾ hemmen demnach die Arbeit der Reduktase.

Versuch 11.

(Ausgeführt von J. G. Platischensky.)

4 Portionen zu je 0,5 g Trockenhefe nach Lebedew wurden in Gläsern von je 15 ccm Inhalt untergebracht. In alle Gläser wurden je 2 Tropfen 0,5%iger Methylenblaulösung in Formamid getan. In das erste Glas wurde reines Formamid gegossen, in das zweite 10 ccm Formamid und 5 ccm Wasser, in das dritte 5 ccm Formamid und 10 ccm Wasser, in das vierte reines Wasser. Die Gläser wurden mit Pfropfen verschlossen. In dem vierten Gläschen trat nach 2 Stunden völlige Entfärbung ein. In den übrigen Gläschen war nach 4 Tagen fast noch gar keine Veränderung zu bemerken, und nur in dem dritten war die Färbung etwas heller geworden.

Versuch 12.

(Ausgeführt von E. W. Elladi.)

5 Portionen zu je 3 g Lebedewscher Trockenhefe und 5 ccm 0,5%iger Lösung von Methylenblau in Äthylalkohol. 1. 45 ccm Äthylalkohol, 2. 40 ccm Äthylalkohol und 5 ccm Wasser, 3. 30 ccm Äthylalkohol und 15 ccm Wasser, 4. 20 ccm Äthylalkohol und 20 ccm Wasser, 5. 45 ccm Wasser.

In der 4. und 5. Portion wird die Entfärbung des Methylenblaus nach 2 bis 3 Stunden deutlich bemerkbar, und nach einem Tage tritt fast vollständige Entfärbung ein. In der 3. Portion erfolgt die Entfärbung am 3. Tage. In der 1. und 2. Portion

¹⁾ Das Pyridin hemmt auch die Arbeit des Emulins. Géza Zemplén, Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 415, 1913.

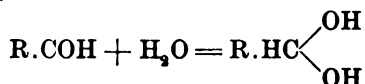
fand keine Entfärbung statt. Die Arbeit der Reduktase wird demnach durch Alkohol gehemmt¹⁾).

Durch die hier mitgeteilten Versuche werden somit folgende Sätze bewiesen:

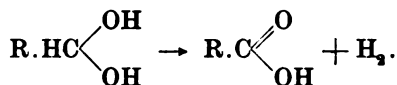
1. Bei (wenn auch teilweise) Ersatz des Wassers durch andere Lösungsmittel (Glycerin, Äthylenglykol, Formamid, Pyridin, Äthylalkohol) wird die Arbeit der Zymase, Carboxylase und Reduktase (Reduktion des Methylenblaus) stark gehemmt oder sogar ganz aufgehoben.

2. Ohne Wasser wird sowohl die Arbeit der Fermente der alkoholischen Gärung wie auch derjenigen des anaeroben Stadiums der Atmung unmöglich gemacht.

Die wichtigste Eigenschaft des Wassers für den Atmungsprozeß ist endlich seine Fähigkeit, mit Hilfe seiner Ionen die Oxydationen und Reduktionen hervorzurufen. Ganz besonderes Interesse bieten, vom physiologischen Gesichtspunkte aus, die Versuche von Wieland²⁾. Dieser Autor beweist die Möglichkeit einer Oxydation der Aldehyde, bei Abwesenheit von Sauerstoff, zur entsprechenden Säure mit Hilfe des Wassers. Es ist von besonderer Wichtigkeit, daß zuerst ein Hydrat zur Bildung gelangt:



„Wenn man feuchten Aldehyd bei Ausschluß von Luft mit Palladiumschwarz schüttelt, so erhält man Säure und Wasserstoff, letzteren an Palladium gebunden.“



In Gegenwart von Methylenblau wird der sich bildende Wasserstoff für die Reduktion dieses Farbstoffs zu einer Leukoverbindung verwendet. Das Wasser ruft demnach gleichzeitig eine Oxydation und eine Reduktion hervor.

¹⁾ Emulsin nach Bourquelot arbeitet gut in starken alkoholischen Lösungen.

²⁾ H. Wieland, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 45, 2606, 1912.

Wieland weist darauf hin, „daß trockenes Silberoxyd mit wasserfreiem Acetaldehyd überhaupt nicht reagiert, während bei Gegenwart von Wasser sofort kräftige Oxydation einsetzt. Außerdem ließ sich beim Vergleich eines isolierbaren und beständigen Hydrats, des Chloralhydrats, mit dem Chloral direkt die Probe aufs Exempel machen. Das Hydrat zeigte sich außerordentlich oxydabel, während das Chloral längere Zeit nicht mit Silberoxyd in Reaktion trat.“ Diese Beobachtungen befinden sich in völliger Übereinstimmung mit älteren Versuchen, die zeigten, daß trockenes Chlor nicht auf geschmolzenes metallisches Natrium einwirkt¹⁾, daß Ammoniak und Chlorwasserstoff in absolut trockenem Zustande in keiner Weise reagieren²⁾, daß trockenes metallisches Natrium sich in wasserfreier Schwefelsäure nicht auflöst³⁾ usw. Weiter unten wird noch ausführlicher auf derartige Fälle von „nasser Autooxydation“ hingewiesen werden.

Alle hier mitgeteilten Tatsachen über die Bedeutung des Wassers für verschiedene physiko-chemische Vorgänge stehen in völliger Übereinstimmung mit meinen theoretischen Auffassungen von dem Prozesse der Atmung höherer Pflanzen, wie sie sich auf Grund der während der letzten Jahre von mir und meinen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen erlangten faktischen Daten bei mir herausgebildet haben. Da sich nun diese theoretischen Auffassungen mit dem Fortschreiten der Arbeiten einigermaßen geändert haben, so möchte ich in dem vorliegenden Aufsätze ein allgemeines Bild von dem Atmungsvorgange bei den Pflanzen geben, wie ich ihn mir gegenwärtig vorstelle.

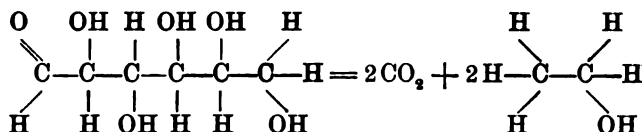
Man unterscheidet zwei Stadien in dem Atmungsprozesse: das anaerobe und das aerobe Stadium. Die während der Atmung ausgeschiedene Kohlensäure wird von allen Erforschern der Atmung in anaerobe und aerobe Kohlensäure eingeteilt. Von der Tatsache ausgehend, daß während der alkoholischen Gärung eine Umlagerung des Sauerstoffs von dem Wasserstoff zum Kohlenstoff stattfindet, worauf schon Hoppe-Seyler⁴⁾ hingewiesen hat,

¹⁾ Wanklyn, Chem. News 20, 271, 1869.

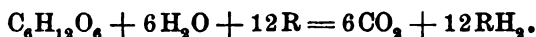
²⁾ Baker, Journ. chem. Soc. 73, 422, 1898.

³⁾ Proc. Chem. Soc. 1894, 86.

⁴⁾ F. Hoppe-Seyler, Arch. f. d. ges. Physiol. 12, 8, 1876.



bin ich zu der Überzeugung gelangt, daß eine ebensolche Umlagerung auch während der Atmung vor sich gehen muß. Da nun in der Glucose nicht die für die Oxydation des gesamten in ihr enthaltenen Kohlenstoffs genügende Menge Sauerstoffs enthalten ist, so folgt hieraus, daß die fehlende Sauerstoffmenge dem Wasser entnommen werden muß¹⁾. Der frei werdende Wasserstoff hingegen wird durch die Wasserstoffacceptoren gebunden. Solche Wasserstoffacceptoren sind in den Pflanzen sehr verbreitet und wurden von mir als Atmungspigmente bezeichnet²⁾. Indem die Pigmente (R) Wasserstoff absorbieren, verwandeln sie sich in Leukoverbindungen (R.H₂), d. h. in Chromogene:



Hieraus zog ich nachstehende Schlußfolgerungen:

3. Während der Atmung der Pflanzen erfolgt eine Assimilation von Wasser.
4. Das assimilierte Wasser wird bei der anaeroben Oxydation der Glucose verausgabt.
5. Die anaerobe Oxydation des in der Glucose enthaltenen Kohlenstoffs erfolgt zur Hälfte auf Kosten des in der Glucose enthaltenen Sauerstoffs und zur Hälfte auf Kosten des Sauerstoffs des während der Atmung assimilierten Wassers.
6. Die gesamte, während der Atmung ausgeschiedene Kohlensäure ist anaeroben Ursprungs.

Die letztere Ansicht war schon früher von Bach und Battelli³⁾ ausgesprochen worden, und zwar auf Grund thermochemischer Betrachtungen: „L'acide carbonique est toujours éliminé par dédoublement, jamais par oxydation directe. Dans l'oxydation l'oxygène se porte sur l'hydrogène, jamais sur le carbone.“

¹⁾ W. Palladin, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 91, 1912.

²⁾ W. Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26a, 125, 1908.

³⁾ Bach und Battelli, Compt. rend., 2. Juni 1903.

Die Richtigkeit meiner Auffassung, wonach die Glucose unter Anteilnahme von Fermenten in sauerstofffreien Medien bei Gegenwart von Wasserstoffacceptoren durch das Wasser in Kohlensäure oxydiert wird, ist in einer soeben erschienenen neuen, sehr interessanten Arbeit von Wieland erwiesen worden¹⁾. Ihr Verfasser beobachtete eine Ausscheidung von Kohlensäure bei der Einwirkung von Palladiumschwarz auf Glucose in sauerstofffreiem Medium in Gegenwart von Methylenblau als Wasserstoffacceptor.

Indem ich ausspreche, daß die Glucose durch Wasser oxydiert wird, will ich damit nicht sagen, daß das gesamte, für die Oxydation der Glucose erforderliche Wasser dieselbe unmittelbar oxydiert. Ich vermute vielmehr, daß die Addition des Wassers unter Bildung von Hydraten allmählich zu verschiedenen Zwischenprodukten der Spaltung der Glucose führt, die durch Wasser viel leichter oxydiert werden als die Glucose. In der Tat hat Wieland in seiner soeben erwähnten Arbeit nachgewiesen, daß die Dehydrierung der Glucensäure viel rascher vor sich geht als die Dehydrierung der Glucose. Besonders leicht geht die Dehydrierung der Milchsäure vor sich, wobei Brenztraubensäure gebildet wird, die auf Grund der Untersuchungen von Neuberg als ein Zwischenprodukt des Glucosezerfalls bei der alkoholischen Gärung (und demnach auch bei der Atmung) angesehen wird. Auf Grund der von Jones ausgearbeiteten Hydrattheorie bin ich der Meinung, daß alle der Einwirkung von Wasser unterliegenden Substanzen mit diesen Hydrate bilden, und daß dann erst die Dehydratation nach dem von Wieland aufgestellten Schema vor sich geht.

Da die primären Stadien der Atmung den primären Stadien der alkoholischen Gärung entsprechen, so ergibt sich hieraus, daß auch während der alkoholischen Gärung eine Assimilierung von Wasser vor sich geht, worauf schon Traube²⁾ und W. Löb³⁾ sowie andere Autoren hingewiesen haben.

Die anfänglichen Stadien der Atmung und der alkoholischen Gärung wird man als eine Aufeinanderfolge durch das Wasser verursachter oxydierender und reduzierender Reaktionen an-

¹⁾ Wieland, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 46, 3327, 1913.

²⁾ M. Traube, Theorie der Fermentwirkungen, S. 105. Berlin 1858.

³⁾ W. Löb, diese Zeitschr. 12, 78, 1908.

sehen müssen. Obgleich die wichtige Bedeutung der Reduktionsreaktionen bei der alkoholischen Gärung von Größ¹⁾ und mir²⁾ nachgewiesen wurde, und wir darauf hinwiesen, daß die Reduktase an derselben unmittelbar Anteil nimmt, so ist den reduzierenden Vorgängen doch bis zur neuesten Zeit nicht die geringste Aufmerksamkeit geschenkt worden. Erst in allerletzter Zeit ist von Bach³⁾ und Neuberg⁴⁾ auf die wichtige Bedeutung dieser Reaktionen in den Prozessen der Atmung und der alkoholischen Gärung hingewiesen worden. Bach⁵⁾ hat eine Theorie von der Arbeit der Reduktase ausführlich ausgearbeitet, auf Grund deren die Reduktionsprozesse unter Anteilnahme des Wassers vor sich gehen. In ihrer in dem von mir geleiteten Laboratorium ausgeführten Arbeit hat Fr. Korsakow⁶⁾ nachgewiesen, daß selensaures Natrium, indem es Wasserstoff entzieht, die Kohlensäuremenge während der durch abgetötete Hefe hervorgerufenen alkoholischen Gärung herabsetzt. Unter Anwendung von Methylenblau als Wasserstoffacceptor haben Palladin, Hübbenett und Korsakow⁷⁾ sowie Malczewski⁸⁾ verschiedenartige, durch diesen Farbstoff im Atmungsvorgange lebender und abgetöteter Samen hervorgerufene Veränderungen feststellen können. Da der Atmungsprozeß bedeutend komplizierter ist als der Prozeß der alkoholischen Gärung, so habe ich mich in meiner darauffolgenden, in Gemeinschaft mit Lvoff ausgeführten Arbeit⁹⁾ wiederum dem Studium der Wirkung der Wasserstoffacceptoren auf die Arbeit der Zymase zugewandt. Als Wasserstoffacceptor wurde der an Chromogen sehr reiche Saft aus weißen Zuckerrüben verwendet. Wir fanden dabei, daß das Pigment, indem es Wasserstoff aufnimmt, die Arbeit der Zymase unterdrückt.

¹⁾ J. Größ, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 27, 686, 1904.

²⁾ W. Palladin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 81, 1908.

³⁾ A. Bach, Oxydationsprozesse in der lebenden Substanz. Oppenheims Handb. d. Biochem. Ergänzt.-Bd. 1913, 133.

⁴⁾ C. Neuberg und Joh. Kerb, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 46, 2228, 1913.

⁵⁾ A. Bach, diese Zeitschr. 31, 443, 1911; 33, 282, 1911.

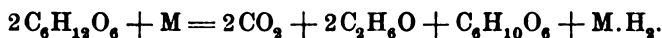
⁶⁾ M. Korsakow, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 1910, 334.

⁷⁾ W. Palladin, Hübbenett und Korsakow, diese Zeitschr. 35, 1, 1911.

⁸⁾ Malczewski, Bull. Acad. Imp. Sc. St. Pétersbourg 1913, 639.

⁹⁾ Palladin und Lvoff, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 2, 238, 1913.

Der vermittels des Atmungspigments oder des Methylenblaus entnommene labile Wasserstoff wird in dem Anfangsstadium der alkoholischen Gärung gebildet, da seine Entnahme nicht nur von einer Verringerung der ausgeschiedenen Kohlensäure, sondern auch von einer in gleichem Verhältnis und in gleicher Quantität erfolgenden Verringerung des gebildeten Alkohols begleitet wird. Hierauf gelangte Lvoff¹⁾, der statt der Atmungspigmente Methylenblau verwandt hatte, zu interessanten Ergebnissen, indem er fand, daß ein jedes vermittels des Methylenblaus entnommene Wasserstoffmolekül die Spaltung eines Glucosemoleküls in Alkohol und Kohlensäure aufhält. Man wird demnach die Abhängigkeit der alkoholischen Gärung von den Reduktionsprozessen durch folgende Gleichung ausdrücken können, in der M das Methylenblau bezeichnet:



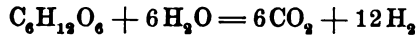
Diesen für die Bildung von Alkohol und Kohlensäure erforderlichen Wasserstoff bezeichne ich als den „nützlichen Wasserstoff“. Indem man eine beträchtliche Menge von Methylenblau verwendet, kann man die Kohlensäureabscheidung und die Alkoholbildung gänzlich unterbrechen und auf diese Weise den Zerfall der Glucose in irgendeinem Anfangsstadium zum Stillstande bringen.

In den Versuchen von Wieland werden sowohl die Oxydations- wie auch die Reduktionsreaktionen auf Kosten des Wassers, als alleinige Folge der Dehydrierung nur durch den Katalysator, d. h. das Palladiumschwarz, hervorgerufen. In Pflanzen werden derartige Reaktionen durch verschiedene Fermente bedingt. Hierzu gehören die Zymase (als Sammelname), Carboxylase, Reduktase und Katalase. Diese fermentativen Reaktionen werden in den Pflanzen noch durch die Notwendigkeit der Gegenwart von Kofermenten kompliziert. Derartige Kofermente sind Phosphate, der Hefekochsaft, sowie nach den neuesten Untersuchungen von Palladin und Stanewitsch²⁾ auch Lipoide.

¹⁾ S. Lvoff, Bull. Acad. Imp. Sc. St. Pétersbourg 1912, 501; Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 2, 289, 1913.

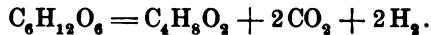
²⁾ W. Palladin und S. Stanewitsch, diese Zeitschr. 26, 351, 1910.

Wir wollen nunmehr zu der Gleichung



zurückkehren.

Wir sehen, daß die totale Oxydation der Glucose auf Kosten des Wassers von einer Anhäufung großer Mengen von Wasserstoff begleitet ist. Das Schicksal dieses Wasserstoffs ist ein dreifaches. Erstens scheiden einige anaerobe Organismen einen Teil des Wasserstoffs direkt in das umgebende Medium ab. Hierzu gehört z. B. die Bakterie der buttersauren Gärung:



Für die Erklärung der Bildung von Fettsäuren unter Ausscheidung von Wasserstoff durch anaerobe Bakterien kann nachstehender Versuch von O. Loew¹⁾ dienen. Dieser Autor hat gefunden, daß aus einer alkalischen Lösung von Formaldehyd bei Gegenwart von Kupferoxydul eine große Menge Wasserstoff ausgeschieden wird. Dabei wird Ameisensäure gebildet. Zweitens verausgabt die Hefe den sich bildenden Wasserstoff für die Reduktion des Endproduktes der Spaltung der Glucose (Acetaldehyd) und scheidet denselben in Gestalt von Äthylalkohol nach außen ab. Nach C. Neuberg²⁾ wird das Zwischenprodukt der Glucosespaltung vielleicht durch das Methylglyoxal, CH₃.CO.CO₂H, dargestellt, aus dem durch Oxydation auf Kosten des Wassers Brenztraubensäure, CH₃.CO.CO₂H, gebildet wird. „Nachdem dann die Brenztraubensäure durch die Carboxylase in Kohlendioxyd und Acetaldehyd gespalten ist, findet nunmehr die Cannizzarosche Reaktion³⁾ zwischen zwei verschiedenen Aldehyden, dem Acetaldehyd und dem Methylglyoxal, statt; dabei werden Äthylalkohol und Brenztraubensäure gebildet. Aus letzterer erzeugt die Carboxylase stets von neuem Kohlendioxyd und Acetaldehyd usw. Immer entsteht und ständig zerfällt die Brenztraubensäure, sie kann sich nie anhäufen, so wenig wie das Methylglyoxal⁴⁾.“ Diese Re-

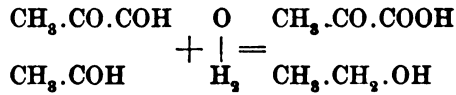
¹⁾ O. Loew, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 20, 144, 1887; 45, 3319, 1912.

²⁾ C. Neuberg, Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle. Jena 1913.

³⁾ Über die biologische Bedeutung der Cannizzaroschen Reaktion siehe J. Parnas, diese Zeitschr. 28, 274, 1910. — Battelli und Stern, diese Zeitschr. 29, 130, 1910.

⁴⁾ C. Neuberg, l. c. S. 14.

aktionen gehen demnach unter Anteilnahme des Wassers vor sich:



und der Vorgang der alkoholischen Gärung besteht aus oxydierenden und reduzierenden Reaktionen auf Kosten des Wassers.

In beiden soeben beschriebenen Fällen können die anaeroben Organismen infolge der Abwesenheit von Sauerstoff den in dem von ihnen ausgeschiedenen Wasserstoff enthaltenen Vorrat von Energie nicht ausnutzen, möge dieser Wasserstoff nun in Gestalt von freiem Wasserstoff oder in Gestalt von Alkohol entfernt werden. Bei dem Vergären der Glucose in Kohlensäure und Alkohol wird demnach beträchtlich weniger Energie gebildet als bei deren Oxydation in Kohlensäure und Wasser.

1. $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{CO}_2 = 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$.
2. $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 2\text{C}_2\text{H}_5\text{O} + 2\text{CO}_2$.

Im ersteren Falle wird die gesamte Verbrennungswärme der Glucose (709 cal) ausgeschieden werden. Im zweiten Falle wird man von den 709 cal die Verbrennungswärme von 2 Molekeln Alkohol abziehen müssen¹⁾.

$$709 \text{ cal} - 2 \cdot 326 \text{ cal} = 57 \text{ cal}.$$

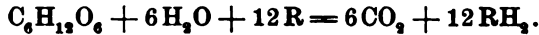
Wir sehen demnach, wie unvorteilhaft es für die Pflanzen wäre, der Möglichkeit beraubt zu sein, den zu ihrer Verfügung stehenden Wasserstoff zu oxydieren. Berücksichtigt man, daß die Verbrennungswärme von 1 g Wasserstoff 34,6 cal beträgt, die Verbrennungswärme von 1 g Kohlenstoff dagegen nur 8 cal, so wird es klar, daß während der Atmung die bedeutendste Energiemenge von dem Wasserstoff, nicht aber von dem Kohlenstoff geliefert wird²⁾.

Aus diesem Grunde wird im dritten Falle, während der Atmung bei Luftzutritt, der gesamte bei der Oxydation der Glucose durch Wasser gebildete Wasserstoff von den Atmungs-

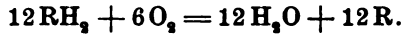
¹⁾ W. Palladin, Die Physiologie der Pflanzen, S. 117. Charkow 1891. (Russisch.)

²⁾ Zu den gleichen Ergebnissen gelangten auch Bach und Battelli (Compt. rend. 2. Juni 1903).

pigmenten (R) aufgenommen, die sich ihrerseits in Chromogen verwandeln (R.H₂)



Auf dieses anaerobe Stadium folgt das aerobe Stadium



Hieraus geht hervor¹⁾:

7. Der während der Atmung höherer Pflanzen infolge der anaeroben Spaltung der Glucose gebildete Wasserstoff wird zeitweilig durch besondere Wasserstoffacceptoren (die Atmungspigmente) aufgenommen.

8. Der gesamte während der Atmung der Pflanzen aufgenommene Sauerstoff wird ausschließlich für die Oxydation des durch die Wasserstoffacceptoren gebundenen Wasserstoffs verwendet.

9. Das während der Atmung gebildete Wasser ist aeroben Ursprunges.

Für die Entfernung des in den Pflanzen gebildeten Wasserstoffs in Gestalt von Wasser ist die Teilnahme von Atmungschromogenen in der Eigenschaft von Wasserstoffacceptoren erforderlich. Schon Reinke²⁾ hat der wichtigen Bedeutung der Chromogene seine Aufmerksamkeit zugewandt. Er bezeichnete sie als Autoxydatoren. Auf die Atmungschromogene bezieht sich eine ganze Reihe meiner eigenen Arbeiten, doch wurde denselben infolge der übermäßigen Bewertung der Bedeutung der Oxydase im Atmungsprozesse nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Erst in letzterer Zeit hat Bach³⁾ auf Grundlage seiner umfassenden Studien über die Reduktase die wichtige Bedeutung der Atmungschromogene anerkannt. Auch Wieland⁴⁾, der sich bei seinen Arbeiten über die Oxydation mit Hilfe von Wasser des Methylenblaus als Wasserstoffacceptor bediente, erkannte die wichtige Bedeutung der Pigmente für den Atmungsprozeß. Ich habe nachgewiesen, daß

¹⁾ W. Palladin, Bull. Acad. Imp. Sc. St. Pétersbourg 1912, Sp. 442; Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 96, 1912.

²⁾ Reinke, Zeitschr. f. physiol. Chem. 6, 213, 1882; Botan. Zeitg. 1883, 65.

³⁾ A. Bach, l. c. S. 180.

⁴⁾ H. Wieland, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 46, 3339, 1913.

„der molekulare Sauerstoff wird durch Oxydasen (Lactase, Tyrosinase, Peroxydase) nur auf Chromogen übertragen. Damit wird die Rolle der Atmungsoxydasen erschöpft“¹⁾. „Zur Nachweisung der Atmungspigmente ist eine Steigerung der Oxydationsprozesse oder eine Hemmung der Reduktionsprozesse erforderlich“²⁾. Es wurde der Nachweis geliefert für die weite Verbreitung der Pigmente³⁾ und für die Bedingungen ihrer Bildung⁴⁾. Da die Atmungschromogene zu den stark wirkenden aromatischen Verbindungen gehören⁵⁾, so werden sie in den Pflanzen in Gestalt von Prochromogenen abgelagert⁶⁾. Derartige Prochromogene stellen die Glucoside oder die Lipide dar⁷⁾. Endlich ist von mir nachgewiesen worden, daß „die Rolle der Atmungspigmente in den Oxydationsprozessen in dem Entziehen des Wasserstoffs von der zu oxydierenden Substanz“ besteht⁸⁾. Die Atmungschromogene werden durch Methylalkohol aus den Pflanzen ausgezogen und nehmen Sauerstoff in alkalischen Lösungen gierig auf⁹⁾. Es bestehen gegenseitige Beziehungen zwischen der Chromogenmenge und der Peroxydasenmenge¹⁰⁾.

Die an Chromogen reichen Pflanzenteile enthalten viel Peroxydase und umgekehrt. Für die Klarlegung der Physiologie der Chromogene und Pigmente und deren Beziehungen zu der Peroxydase sind die Arbeiten nachstehender Autoren von besonderem Interesse: Bartlett¹¹⁾, Combes¹²⁾, Fit-

1) W. Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26a, 125, 1908.

2) W. Palladin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55, 207, 1908.

3) W. Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26a, 378, 1908.

4) W. Palladin, ebenda 26a, 389, 1908.

5) W. Palladin, diese Zeitschr. 18, 151, 1909.

6) W. Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 27, 101, 1909.

7) W. Palladin, diese Zeitschr. 27, 442, 1910.

8) W. Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 30, 104, 1912; Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 91, 1912.

9) W. Palladin und Z. Tolstaja, diese Zeitschr. 49, 381, 1913.

10) W. Palladin und P. Iraklionoff, Rev. gén. de botan. 23, 225, 1911.

11) H. H. Bartlett, U. S. Department of Agriculture. Bureau of plant industry. Bulletin Nr. 264. Washington 1913.

12) R. Combes, Annales des Sciences naturelles. Botanique, 9 série 9, 275, 1909; 16, 1, 1912. Revue générale de botanique 22, 177, 1910. Compt. rend. 150, 1532, 1910; 153, 886, 1911. Association française pour l'avancem. d. sc. 40 session, 2, 464, 1912.

ting¹⁾, Grafe²⁾, Keeble³⁾, Majima⁴⁾, Tammes, Weewers⁵⁾, Wheldale⁶⁾, Nierenstein⁷⁾ und Willstätter⁸⁾. Bei Beginn meiner Studien über die Atmungschromogene war mir deren Rolle im Atmungsprozeß nicht vollständig klar. Ich nahm an, daß dieselben als Überträger des Sauerstoffes auf die zu oxydierenden Stoffe dienen⁹⁾ oder Sauerstoffspeicher sein könnten¹⁰⁾. Späterhin habe ich mich aber in ganz bestimmter Weise dafür ausgesprochen, daß dieselben, gleich dem Methylenblau, die Rolle von Wasserstoffacceptoren für die Entfernung des Wasserstoffs aus den Pflanzen in Gestalt von Wasser ausüben¹¹⁾. In den am Ende des gleichen Jahres erschienenen Studien von Wieland¹²⁾ über den Chemismus der Oxydationsprozesse habe ich eine volle Bestätigung meiner Ansichten über die Rolle der Atmungschromogene finden können.

Die Chromogene arbeiten im Protoplasma im alkalischen Medium. Die im Zellsaft vorhandenen Pigmente (Anthocyane) können keinesfalls als einfache Oxydationsprodukte der Atmungschromogene angesehen werden, wenn auch die Atmungsenergie während ihrer Bildung gesteigert wird¹³⁾. Unter normalen Bedingungen wird das aus dem Atmungschromogen hervor-

¹⁾ H. Fitting, Zeitschr. f. Botanik 4, 81, 1911.

²⁾ V. Grafe, Sitzungsber. Wiener Akad. Math. Naturw. Kl. Abt. 1 118, 1033, 1909; 120, 765, 1911.

³⁾ F. Keeble und E. F. Armstrong, Journ. of genetics 2, 277, 1912. — F. Keeble, S. F. Armstrong und W. N. Jones, Proceedings of the Royal Society 86, 308, 1913.

⁴⁾ R. Majima, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 4390, 1907; 42, 1418, 3634, 1909; 45, 2727, 1912.

⁵⁾ Th. Weewers, Betrachtungen und Untersuchungen üb. d. Nekrobiose usw. Amersfoort 1912.

⁶⁾ M. Wheldale, Journ. of genetics 1, 133, 1911. Bioch. Journ. 7, 87, 1913.

⁷⁾ N. Nierenstein, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 44, 3487, 1911; 45, 499, 1912.

⁸⁾ R. Willstätter, Annal. d. Chem. 401, 188, 1913.

⁹⁾ Aus diesem Grunde habe ich dieselben als Phytohämatine bezeichnet. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26a, 131, 1908.

¹⁰⁾ W. Palladin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55, 221, 1908.

¹¹⁾ W. Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 30, 104, März 1912. Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 91, Mai 1912.

¹²⁾ H. Wieland, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 45, 2606, 1912.

¹³⁾ R. Combes, Revue générale de botanique 22, 177, 1910.

gegangene Pigment sofort von neuem zu Chromogen reduziert. Die im Zellsaft vorhandenen Anthocyane dagegen nehmen augenscheinlich keinerlei Anteil an dem Prozeß der Atmung. Wenn die Anthocyane das Ergebnis einer einfachen Oxydation der Atmungschromogene darstellen und am Atmungsprozesse teilnehmen würden, so müßten die Blumen sowie die farbigen Blätter im sauerstofffreien Medium entfärbt werden. In meinem Laboratorium von Frl. Tolstaja ange stellte Versuche mit verschiedenen farbigen Blättern und Blumen haben indessen gezeigt, daß diese letzteren selbst nach sehr langdauerndem Aufenthalt in einer sauerstofffreien Atmosphäre ihre Farbe nicht veränderten, solange sie am Leben blieben. Die Bildung der Anthocyane ist ein sehr verwickelter Vorgang. So können Pigmente nach Chodat¹⁾ durch gleichartige Oxydation des Chromogens und seiner Verbindung mit verschiedenen Aminosäuren erzielt werden. Combes²⁾ erhielt bei der Einwirkung von Wasserstoff in statu nascendi auf eine aus grünen Blättern von *Ampelopsis* ausgeschiedene gelbbraune Substanz ein Pigment, welches mit dem Pigment aus den Herbstblättern von *Ampelopsis* übereinstimmt. Nach Tswett³⁾ in Äpfeln sowie in einigen anderen Objekten sind alkohollösliche, vielleicht tannoide Stoffe vorhanden, die durch starke Mineralsäuren in Gegenwart von Formaldehyd oder Acetaldehyd in einen anthocyanähnlichen Farbstoff verwandelt werden. Nach den Versuchen von Willstätter⁴⁾ stellt das Anthocyan aus Kornblumenblättern (Cyanin) ein Glucosid dar. Die Anthocyane bilden sich demnach infolge einer Synthese des Chromogens mit der Glucose und vielleicht auch mit den Zerfallsprodukten der Eiweißstoffe (Chodat). Die Atmungspigmente dagegen bilden das Resultat einer einfachen Oxydation der Chromogene.

Für uns ist die weite Verbreitung des Anthocyan in den Pflanzen von Wichtigkeit, und zwar als ein Beweis für die weite Verbreitung der chromogenen Gruppen in denselben.

¹⁾ Chodat, Archives des sciences physiques et naturelles (4) **33**, 350, 1912; **34**, 315, 1912; **35**, 1, 1913.

²⁾ Combes, Compt. rend. **157**, 1002, 1913.

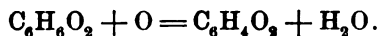
³⁾ M. Tswett, diese Zeitschr. **58**, 225, 1913.

⁴⁾ Willstätter, Annal. d. Chem. **401**, 189, 1913.

10. Die Anthocyane nehmen keinen unmittelbaren Anteil an dem Atmungsprozeß.

Auf Grund der Arbeiten von Spina¹⁾ sind auch bei den Tieren Pigmente vorhanden, welche die Rolle von Wasserstoffacceptoren für die Entfernung des Wasserstoffes in Gestalt von Wasser spielen. Spina hält dieselben irrtümlicherweise für Überträger des Sauerstoffes auf die zu oxydierenden Substanzen. Auch die bei den wirbellosen Tieren stark verbreiteten Chromogene (das sog. „farblose Blut“²⁾) dienen aller Wahrscheinlichkeit nach als Wasserstoffacceptoren. Die nicht gesättigten Phosphatide der Nieren und namentlich des Gehirnes dienen nach Fränkel als Überträger des Sauerstoffes. „Man kann solche Substanzen, die in den Geweben Oxydationen und Reduktionen durchführen, aber gar keine enzymatischen Funktionen haben, Intermediärkörper nennen“³⁾.

Die Oxydation des durch die Atmungspigmente gebundenen Wasserstoffes auf Kosten des Sauerstoffes der Luft geht bei Anteilnahme der Peroxydase vor sich⁴⁾. Ich habe schon längst darauf hingewiesen, daß die oxydierende Eigenschaft der an dem Atmungsprozesse teilnehmenden Peroxydasen eine sehr geringe ist. Ihre Bedeutung beschränkt sich nur auf die Entnahme des Wasserstoffes von dem Atmungschromogen und auf dessen Oxydation zu Wasser. So wird z. B. das Hydrochinon nur bis zum roten Chinon oxydiert



Hieraus folgt:

11. Die Peroxydasen stellen wasserbildende Fermente dar.

12. Die Peroxydasen stellen pigmentbildende Fermente dar.

¹⁾ A. Spina, Experimentelle Beiträge zu der Lehre von der inneren Atmung der Organe. Prag 1889.

²⁾ O. von Fürth, Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere. Jena 1903.

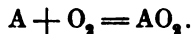
³⁾ S. Fränkel, Dynamische Biochemie. S. 34. Wiesbaden 1911.

⁴⁾ Ich bezeichne die oxydierenden Fermente als Peroxydasen auf Grund der Angaben von Chodat und Bach, die nachgewiesen haben, daß die Oxydasen eine Mischung der Peroxydase mit fremden Substanzen (Oxygenasen) darstellen.

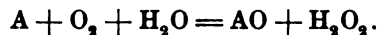
13. Die Atmungspigmente stellen Vermittler dar zwischen den Produkten der anaeroben Spaltung der Glucose und den Peroxydasen, indem letztere nur aromatische Verbindungen von bestimmtem Baue oxydieren können.

Untersuchungen über den Mechanismus der Oxydation mit Hilfe oxydierender Fermente haben gezeigt, daß die einen derselben (die Laccase) aromatische Verbindungen von bestimmter Zusammensetzung ohne Hinzufügung von Wasserstoffhyperoxyd oxydieren. Andere dagegen (die Peroxydase) oxydieren diese Verbindungen nur bei Gegenwart von Wasserstoffhyperoxyd. Auf Grund dieser Beobachtung sind Bach und Chodat der Ansicht, daß die Oxydasen (vom Laccase-Typus) aus Peroxydase und einem zusammengesetzten organischen Hyperoxyd (Oxygenase) bestehen, die das bei Versuchen in vitro hinzugefügte Wasserstoffhyperoxyd ersetzen. Die erwähnten Autoren haben mit Erfolg versucht, die Oxydase in Peroxydase und Oxygenase zu zerlegen¹⁾.

Nach der Theorie von Engler-Bach nimmt der zu oxydierende Körper ein ganzes Molekül Sauerstoff auf, indem er ein Hyperoxyd bildet (Oxygenase im Atmungsprozeß):



Ein solcher Oxydationsmodus wird als trockene Autoxydation bezeichnet. Er ist für viele chemische Prozesse nachgewiesen worden. Nach der Theorie von M. Traube²⁾ geht die Autoxydation ebenfalls mit Teilnahme des Wassers unter Bildung von Wasserstoffhyperoxyd vor sich:



Von einer ganzen Reihe von Forschern³⁾ ist die Bildung von Wasserstoffhyperoxyd während des Vorganges der „nassen Autoxydation“ nachgewiesen worden⁴⁾. Die Theorie von Engler-

¹⁾ Chodat und Bach, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **36**, 606, 1904.

²⁾ M. Traube, l. c. — Schönbein, Journ. f. prakt. Chem. **81**, 16, 1860.

³⁾ W. Mauchot, Über Sauerstoffaktivierung (Verhdl. phys. med. Ges. Würzburg. N. F. **39**, 1908). Über die Bedeutung des Wassers: Boussingault, Ann. chim. phys. (3) **35**, 36; Berthelot, Compt. rend. **125**, 277, van't Hoff-Cohen, Chem. Dynamik, 2 Teil, S. 277.

⁴⁾ F. Haber, Zeitschr. f. physikal. Chem. **34**, 513, 1900. — F. Haber und F. Bran, l. c. **35**, 81, 1900.

Bach und diejenige von Traube schließen einander nicht aus: bei den einen Reaktionen haben wir es mit trockener Autoxydation, bei den anderen mit nasser Autoxydation zu tun. In Pflanzen hingegen haben wir es nur mit nasser Autoxydation zu tun.

Die vegetabilischen Chromogene werden oxydiert nur bei Gegenwart von Wasser. So wird nach den von N. A. Bessanoff in meinem Laboratorium ausgeführten Versuchen Hämatoxylin, $C_{16}H_{14}O_6$, nur bei Gegenwart von Wasser, in Hämatein, $C_{16}H_{14}O_6$, oxydiert. Eine alkoholische Lösung von Hämatoxylin wird nicht an der Luft oxydiert. Die Oxydation beginnt erst nach Hinzufügung von Wasser. Die Geschwindigkeit der Oxydation hängt von der Menge des hinzugefügten Wassers ab. Auch Keeble¹⁾ hält die Anteilnahme des Wassers bei der Oxydation der Chromogene für notwendig. Nach der Theorie von Traube müssen die Chromogene unter der Einwirkung des Wassers zunächst Hydrate bilden, worauf sie durch den Sauerstoff der Luft unter gleichzeitiger Bildung von Wasserstoffhyperoxyd oxydiert werden. Die Theorie von Bach und Chodat muß dahingehend abgeändert werden, daß die Oxydation unter Anteilnahme des Wassers vor sich geht.

14. Die Oxydation der Chromogene mit Hilfe der Peroxydase (zur Entfernung des Wasserstoffes) verläuft nach dem Schema der nassen Autoxydation.

Es muß ferner noch die Natur der von diesen Autoren Oxygenenase genannten rätselhaften Substanz klargestellt werden. Es fragt sich, ob dies in der Tat ein zusammengesetztes Hyperoxyd ist, das vielleicht unter Mitwirkung von Wasserstoffhyperoxyd gebildet wird, oder aber nur eine den Oxydationsprozeß beschleunigende Substanz. So weisen Haber und Bran²⁾ darauf hin, daß durch den Sauerstoff der Luft schwer oxydierbare und für Wasserstoffhyperoxyd unempfindliche Körper bei Gegenwart von Substanzen, die für Wasserstoffhyperoxyd empfindlich sind, leicht zu oxydieren beginnen. So oxydiert arsenignsaureres Natrium leicht bei Gegenwart von Schwefelnatrium, Benzaldehyd bei Gegenwart von Indigo. Ob-

¹⁾ Keeble, Armstrong und Jones, Proc. of the Roy. Soc. 86, 308, 1913.

²⁾ l. c.

gleich der Indigo für Wasserstoffhyperoxyd unempfindlich ist, so wird er bei Gegenwart der während der Oxydation des Benzaldehyds gebildeten Benzoesäure (als Katalysator) doch empfindlich für dasselbe¹⁾. Endlich ist auch eine Oxydation ohne Teilnahme helfender Substanzen möglich, da die Oxydation in dem Protoplasma mit alkalischer Reaktion vor sich geht, während nach den Untersuchungen von Palladin und Tolstaja²⁾ die Atmungschromogene in alkalischen Medien ohne Teilnahme von Peroxydase gierig Sauerstoff aufnehmen.

Da bei den höheren Pflanzen die Ausscheidung von Kohlensäure von einer Bildung von Wasserstoff begleitet ist, der von besonderen Wasserstoffacceptoren (den Atmungschromogenen) gebunden wird, so folgt hieraus, daß Kohlensäure in sauerstofffreier Atmosphäre nur so lange ausgeschieden werden kann, als der sich bildende Wasserstoff eine Verwendung finden wird. In an Chromogenen armen Stoffen (Erbsensamen) wird der Wasserstoff bei anaeroben Bedingungen für die Reduktion der Zwischenprodukte der Glucosespaltung (Acetaldehyd) verwendet und die anaerobe Atmung verwandelt sich in eine alkoholische Gärung. In an Wasserstoffacceptoren reichen Organen wird während der anaeroben Atmung nur wenig oder gar kein Alkohol gebildet, indem ein mehr oder weniger beträchtlicher Teil des Wasserstoffes von den Wasserstoffacceptoren (möglicherweise nicht nur von den Pigmenten allein) aufgenommen wird. Wenn der sich während der Anaerobiose bildende Wasserstoff aus irgendwelchen Gründen nicht zur Bildung von Alkohol verwendet werden kann, so kann die Ausscheidung von Kohlensäure nur so lange andauern, bis alle Wasserstoffacceptoren gesättigt sein werden. Wenn man indessen Pflanzen, die bei anaeroben Bedingungen die Ausscheidung von Kohlensäure infolge Sättigung der Wasserstoffacceptoren eingestellt haben, Sauerstoff gibt, so beginnt von neuem eine intensive und oft sehr stürmische Ausscheidung von Kohlensäure. So wird z. B. bei der Alge *Chlorothecium saccharo-*

¹⁾ Über Substanzen, die die Oxydationsprozesse begünstigen, siehe auch die Arbeiten: Ed. Schaer, *Annal. d. Chem.* **323**, 32, 1912. — A. Job, *Annales de chimie et de physique*. 7 série, **20**, 205, 1900; *Compt. rend.* **136**, 45, 1913.

²⁾ W. Palladin und Z. Tolstaja, diese Zeitschr. **49**, 381, 1913.

philum auf Raffinose in den ersten Stunden nach der Anaerobiose die Kohlensäureausscheidung bis zu 340⁰/₀ über der Norm erhöht¹⁾. Man erhält den Eindruck, als wäre diese Kohlensäure das Ergebnis einer direkten Oxydation. Allein es ist auch noch eine andere Erklärung möglich: der Sauerstoff entnimmt den Wasserstoffacceptoren den Wasserstoff, so daß die Zwischenprodukte der Glucosespaltung die Möglichkeit erhalten, sich weiter in Kohlensäure und Wasserstoff zu spalten, der von den freigewordenen Wasserstoffacceptoren aufgenommen wird. Ein gutes Beispiel für eine solche Entstehung der Kohlensäure bietet der Versuch von Bredig und Sommer²⁾. Diese Autoren haben nachgewiesen, daß Ameisensäure bei Gegenwart eines Katalysators und von Methylenblau (M) als Wasserstoffacceptor sich in Kohlensäure und Wasserstoff spaltet, der von dem Methylenblau aufgenommen wird:



Die Kohlensäureausscheidung kann so lange andauern, als Methylenblau vorhanden ist. Nach Einführung von Sauerstoff beginnt die Kohlensäureausscheidung von neuem, weil die oxydierte Leukoverbindung ($\text{M.H}_2 + \text{O} = \text{M} + \text{H}_2\text{O}$) von neuem die Möglichkeit erhält, Wasserstoff aufzunehmen.

Die in meinem Laboratorium von Fr. Petraschewsky³⁾ ausgeführten Bestimmungen des Atmungskoeffizienten ($\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$) bei Chlorothecium nach andauernder Anaerobiose haben nachstehendes Resultat ergeben:

	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
Nach 3 Stunden	0,83
" 7 " 	1,70
" 9 " 	2,50
" 12 " 	1,20
" 15 " 	0,81

Vor der Anaerobiose war $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 0,91$. Der Atmungskoeffizient wird demnach in den ersten Stunden nach der Anaerobiose,

¹⁾ W. Palladin, Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 11, 146, 1903.
²⁾ Bredig und Sommer, Zeitschr. f. physikal. Chemie 70, 34, 1910.
³⁾ L. Petraschewsky, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 22, 323, 1904.

trotz der starken Kohlensäureausscheidung, geringer als bei normalen Bedingungen. Während dieser Zeit geht eine energische Wasserbildung und eine erhöhte Befreiung der Wasserstoffacceptoren vor sich. Hierauf steigt der Koeffizient bis zu 2,5, d. h. es beginnt eine anaerobe Kohlensäureausscheidung trotz sehr guter Aeration. Dies bedeutet, daß infolge der Befreiung der Wasserstoffacceptoren eine erhöhte anaerobe Spaltung der Zwischenprodukte an der Luft begonnen hat.

An abgetöteten Pflanzen angestellte Versuche zeigen auch, daß der Sauerstoff für die Entfernung des Wasserstoffs notwendig ist. Man wird im Auge behalten müssen, daß in abgetöteten Pflanzen nur die (anaeroben) Anfangsstadien der Atmung mehr oder weniger normal verlaufen, während die End-(Oxydations-)Prozesse entweder ganz eingestellt werden oder aber in anormaler Weise verlaufen. So scheiden z. B. abgetötete Weizenkeime in der Luft wie auch in Wasserstoff gleiche Mengen Kohlensäure aus. Auf Grund eines solchen Versuchs¹⁾ habe ich den irrtümlichen Schluß gezogen, in diesen Keimen sei keine Peroxydase enthalten.

Später von mir angestellte Versuche haben indessen gezeigt, daß die Weizenkeime sehr reich an Peroxydase sind. Die an Chromogenen reichen, etiolierten Bohnenblätter schieden im Gegenteil nach dem Erfrieren an der Luft weniger Kohlensäure aus als ebensolche Blätter, die zuvor in einen Wasserstoffstrom und erst nach dem Aufhören der Kohlensäureausscheidung in einen Luftstrom verbracht wurden, wo sie von neuem beginnen, Kohlensäure auszuscheiden. So haben 100 g etiolierter Bohnenblätter nach dem Gefrierenlassen folgende Mengen von Kohlensäure ausgeschieden¹⁾:

Stunden	Luft	Wasserstoff
4	153	92
4	102	26
1	88	48
—	—	Luft
3	Spuren	163
6	—	92
15	—	53
47	343	474

¹⁾ W. Palladin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 407, 1906.

Diese Tatsache läßt sich dadurch erklären, daß die Chromogene an der Luft rasch in Pigmente oxydiert werden, die in abgetöteten Pflanzen nicht den der Oxydation bis zu Wasser unterliegenden Wasserstoff (den schädlichen Wasserstoff) entnehmen, sondern den Wasserstoff der Anfangsstadien der Atmung (den nützlichen Wasserstoff), wie dies in den von mir und Lvoff angestellten Versuchen über die Wirkung des Chromogens der Runkelrübe und des Methylenblaus auf die alkoholische Gärung der Fall gewesen ist. In den Versuchen mit Methylenblau ist die Rolle dieses Farbstoffs auch hierauf beschränkt. In dem Falle mit Chromogenen kann deren schädlicher Einfluß in abgetöteten Pflanzen auch noch davon abhängen, daß sie mit irgendwelchen Zwischenprodukten der Glucosespaltung eine Verbindung eingehen und dieselben der Möglichkeit berauben können, eine weitere Spaltung bis zur Kohlensäure durchzumachen. Endlich gelangt ein dritter Fall zur Beobachtung, wenn nämlich abgetötete Pflanzen an der Luft mehr Kohlensäure ausscheiden als in Wasserstoff. So schieden Erbsensamen (zu je 200 Stück) im Verlaufe von 28 Stunden an der Luft 1482 mg Kohlensäure aus, in Wasserstoff dagegen nur 775,2 mg¹⁾. Dieser Versuch zeigt deutlich, daß der an der Luft erzielte Überschuß von Kohlensäure nicht das Ergebnis der Oxydation ist, indem die Samen in Wasserstoff 552,7 mg Alkohol bildeten, an der Luft dagegen beträchtlich mehr, und zwar 1013,4 mg. Der Sauerstoff stimuliert demnach die Alkoholbildung, zu Oxydationsprozessen hingegen sind abgetötete Erbsensamen beinahe gar nicht befähigt. Die Stimulierung des Prozesses der Alkoholbildung durch Sauerstoff läßt sich dadurch erklären, daß derselbe auch im gegebenen Falle als Wasserstoffacceptor dient. In meinem Laboratorium ausgeführte Versuche²⁾ haben dies bestätigt. In Methylenblaulösung aufgeweichte lebende Erbsensamen scheiden im Wasserstoffstrom mehr Kohlensäure aus und bilden mehr Alkohol als Samen, die keinen Farbstoff erhalten haben. L. A. Iwanoff³⁾ erklärt die erhöhte Kohlen-

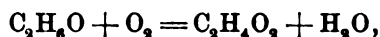
¹⁾ W. Palladin und S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chem 48, 214, 1906.

²⁾ W. Palladin, E. Hübbenett und M. Korsakow, diese Zeitschrift 35, 1, 1911.

³⁾ L. Iwanoff, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 29, 563, 622, 1911.

säureabscheidung durch abgetötete Erbsensamen an der Luft durch die Überführung des Zymogens in Zymase mit Hilfe des Sauerstoffs. Ohne in der vorliegenden Arbeit auf eine solche Rolle des Sauerstoffs einzugehen, bin ich der Ansicht, daß auf Grund der in unserem Laboratorium angestellten Versuche über die erhöhte Alkoholbildung bei Einwirkung von Alkohol wie auch von Methylenblau der Sauerstoff in diesem Falle als Wasserstoffacceptor angesehen werden muß. Da die Entfernung des Wasserstoffs mit Hilfe von Methylenblau in Erbsensamen von einer erhöhten Alkoholbildung begleitet ist, so bezeichne ich diesen Wasserstoff als „schädlichen Wasserstoff“. Durch die Versuche von Lvoff¹⁾ wird das Vorhandensein dieses Wasserstoffs auch während der typischen, durch Hefe hervorgerufenen alkoholischen Gärung nachgewiesen: indem er abgetöteter Hefe während der Selbstgärung Methylenblau gab, beobachtete dieser Autor eine erhöhte Kohlensäurebildung.

Ganz besonders typisch und im höchsten Grade interessant, indem hier die Bedeutung des Sauerstoffs als Wasserstoffacceptor ganz besonders deutlich hervortritt, ist der Versuch von Wieland²⁾ mit lebenden und abgetöteten Essigbakterien (*Bacterium aceti*). Es gelang diesem Autor, Alkohol mit Essigbakterien in Abwesenheit von Sauerstoff in Essigsäure zu oxydieren, indem er ihnen statt Sauerstoff Methylenblau (oder Chinon) als Wasserstoffacceptor gab. Auf Grund dieses Versuchs geht hervor, daß die Oxydation des Alkohols nicht auf Kosten des Sauerstoffs der Luft vor sich geht, wie dies bisher angenommen wurde:



sondern auf Kosten des Sauerstoffs des Wassers:

1. $C_2H_6O + H_2O = C_2H_4O_2 + 2H_2$
2. $2H_2 + O_2 = 2H_2O.$

Der aufgenommene Sauerstoff oxydiert dagegen nur den übriggebliebenen Wasserstoff.

Eine derartige Erklärung für den Mechanismus der Alkohol-oxydation durch Essigbakterien bringt uns auf den Gedanken, daß viele (wenn nicht alle) übrigen Fälle der vermutlichen

¹⁾ S. Lvoff, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 3, 312, 1913.

²⁾ H. Wieland, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 46, 3327, 1913.

Assimilierung atmosphärischen Sauerstoffs durch Pflanzen zur Bildung stark oxydierender Verbindungen (organischer Säuren aus Kohlenhydraten, Kohlenhydraten aus Öl, Asparagin aus Eiweißstoffen) auf eine Oxydation auf Kosten des Wassers zurückzuführen sein werden, d. h. auf eine Assimilation des Sauerstoffs des Wassers, nicht aber des Sauerstoffs der Luft. Der während dieser Vorgänge aufgenommene Luftsauerstoff dient dagegen nur zur Oxydation des sich bildenden Wasserstoffes.

Es folgt hieraus:

15. Der während der Atmung aufgenommene Sauerstoff funktioniert nur als Wasserstoffacceptor.

16. Die meisten (wenn nicht alle) gegenwärtig angenommenen Fälle der Assimilation des Sauerstoffs der Luft lassen sich auf eine Assimilation des Sauerstoffs des Wassers zurückführen.

Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden. II.

Von

H. M. Vernon.

(Aus dem Physiologischen Laboratorium der Universität Oxford.)

(Eingegangen am 26. Dezember 1913.)

Mit 7 Figuren im Text.

In einer früheren Arbeit¹⁾ habe ich gezeigt, daß, wenn zerriebene Niere oder anderes Gewebe $\frac{1}{2}$ Stunde lang mit geeigneten Konzentrationen gewisser Narkotica behandelt wird, die Oxydationskraft des Gewebes einem Gemisch von α -Naphthol und Paraphenylendiamin gegenüber entweder unverändert bleibt oder etwas erhöht ist. Bei steigendem Konzentrationsgrad der Narkotica wird die Oxydase plötzlich gehemmt und bei der doppelt so großen Konzentration wie anfangs gänzlich zerstört. Er ergab sich, daß die oxydaseabtötenden Konzentrationen verschiedener Narkotica mit den auf Kaulquappen narkotisch wirkenden und mit den die Hämolyse herbeiführenden parallel laufen. Aus dieser Übereinstimmung wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die Tätigkeit dieser Indophenoloxydase von Lipoiden abhängig ist.

Battelli und Stern²⁾ haben kürzlich die Einwirkung von Leber und Muskel im zerhackten Zustande auf Bernsteinsäure untersucht, deren Oxydation zu Äpfelsäure dadurch beschleunigt wird. Der Urheber dieser Wirkung soll ein „Succinicoxydon“ sein. Dieser Körper ist aller Wahrscheinlichkeit nach dasselbe Enzym wie die von mir erforschte Indophenoloxydase. Wegen seiner Unlöslichkeit in Wasser ziehen die

¹⁾ Vernon, Journ. Physiol. **45**, 197, 1912. Diese Zeitschr. **47**, 374, 1912; **51**, 1, 1913.

²⁾ Battelli und Stern, diese Zeitschr. **52**, 226, 1913.

Autoren es aber vor, ihn ein Oxydon und nicht ein Enzym zu nennen. Gegenüber Narkoticis reagiert er wie die Indophenoloxydase, sowohl in bezug auf die zuerst einwirkenden wie völlig lähmenden Konzentrationen. Battelli und Stern stellen sich aber zu meiner Auffassung, daß seine Wirkungskraft zu den Lipoiden in engster Beziehung steht, in Widerspruch. Warburg und Wiesel¹⁾ geben an, daß verschiedene Narkotica im Hefepreßsaft bei ähnlichen Konzentrationen, welche die Oxydationsprozesse in lebenden Zellen zum Stillstand bringen, eine Niederschlagsbildung bewirken. Analog finden Battelli und Stern, daß bei wässrigen Auszügen von Leber und Muskel, die mit Narkoticis vermischt und zentrifugiert sind, auch bei ungefähr dem auf das Oxydon einwirkenden Stärkegrad eine Fällung einsetzt. Wird die Konzentration auf eine solche erhöht, die Zerstörung des Oxydons zur Folge hat, so werden die Lösungen vollständig, unter Bildung einer klaren überstehenden Flüssigkeit, ausgefällt. Aus diesem Grunde schreiben nun die Autoren die zerstörende Kraft der Narkotica ihrer Wirkung auf die unlöslichen Gewebsproteine zu. Dieser Schluß scheint auf den ersten Blick den Versuchsergebnissen diametral entgegengesetzt zu sein, denn das untersuchte präcipitierende Agens bezog sich auf die löslichen Nucleoproteine der Gewebe, während die Indophenoloxydase oder das Oxydon zweifellos ein gänzlich unlöslicher Körper ist. Battelli und Stern behaupten aber, ohne jedoch ihre Behauptung irgendwie zu begründen, daß sich die löslichen Nucleoproteine wahrscheinlich „am meisten den in den Geweben enthaltenen unlöslichen Proteinen nähern“.

Vergleicht man die Konzentrationen von 16 Narkotica, die nach Angabe von Battelli und Stern 15 bis 20% des aus Ochsenmuskel stammenden Oxydons bei 15° zerstören, mit den von mir gefundenen, welche die Oxydase aus Kaninchenniere bei 17° hemmen, so weisen sie mit einer Ausnahme Verhältniszahlen für Oxydon zu Oxydase auf, die zwischen 0,9 und 2,7 schwanken. Der Quotient der narkotischen Konzentration, die zuerst auf eine Emulsion von Schafsleber fallend wirkt — die von den Autoren genannte „kritische Konzentration“ — und Muskeloxydonkonzentration bewegte sich zwischen 0,88 und

¹⁾ Warburg und Wiesel, Arch. f. d. ges. Physiol. 144, 465, 1912.

2,00 bei 40°, und von 0,66 bis 3,67 bei 15°. Sieht man von o-Kresol und Phenol ab, so geben die übrigen Narkotica Werte von 0,88 bis 1,71 bei 40° und von 0,66 bis 1,54 bei 15°, d. h. sind somit ziemlich konstant. Jedoch ist das Verhältnis zwischen kritischer zur Oxydasekonzentration keineswegs beständig, sondern steigt von etwa 1,00 für in hohen Konzentrationen wirkenden Substanzen (Methylalkohol, Äthylalkohol, Aceton) auf Werte von über 2,2 an für Stoffe, die in mittlerer Stärke aktiv sind (Methylpropylketon, Propylurethan, Isoamylalkohol) und erreicht Zahlen bis 3,3 und darüber bei solchen, die schon in schwacher Konzentration ihre Wirkung entfalten (Phenol, o-Kresol, Chloroform). Daher erschien es mir angebracht, genaue Bestimmungen über die Fällbarkeit der Leber- und Nierenaufschwemmungen mit zahlreichen Konzentrationen typischer Narkotica vorzunehmen, um experimentell gesicherte Anhaltspunkte darüber zu erlangen, ob die Übereinstimmung mit meinen in der vorhergehenden Arbeit mitgeteilten Kurven der Oxydasezerstörung wirklich besteht oder nicht.

Die Fällbarkeit von Gewebsaufschwemmungen. Die angewandte Versuchsmethode lehnte sich an die von Battelli und Stern beschriebene an. Kaninchenleber wurde in einem Mörser mit etwas Sand gut zerstampft, mit 3 Volumina Wasser versetzt und gründlich durchmischt; nach kurzem Stehen wurde die Lösung 20 Minuten lang zentrifugiert, darauf die milchige, oben schwimmende Flüssigkeit abpipettiert. Je 4 ccm davon kamen in graduierte Zentrifugenröhren. Diese füllte man mit Wasser und Narkoticum bis auf 10 ccm auf, schüttelte die Röhren in einem Schüttelapparat 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur (ca. 16°). Hierauf zentrifugierte man 4 Minuten in einer Rapidzentrifuge und notierte die Menge des Niederschlags. Das Maximum desselben belief sich auf 2,4 ccm, während Kontrollversuche mit Lösungen ohne Zusatz von Narkoticum Präcipitate von nur 0,2 ccm oder weniger ergaben. Diese Menge wurde von der gesamten Niederschlagsmenge abgezogen und der Rest in Prozenten des maximalen, von jedem Narkoticum ausgefallten Volumen berechnet. Gleiche Versuche wurden mit Nierenaufschwemmungen angestellt, nur mit der Abänderung, daß hier 4 Raumteile Wasser anstatt 3 verwandt wurden.

Fig. 1 veranschaulicht einige mit Äthylalkohol erzielte Resultate. Die punktierte Kurve, die aus früher mitgeteilten Versuchen kopiert ist, stellt die durch verschieden starke Alkohollösungen in einer halben Stunde zerstörte Oxydasemenge dar. Die ausgezogenen Kurven verbildlichen die Niederschlagsmengen aus Leber- und Nierenemulsionen. Ein Vergleich ergibt eine ziemlich gute Übereinstimmung. Die Pfeile markieren annähernd die Konzentrationen, bei denen sich die milchigen Lösungen wegen der vollständigen Ausfällung der Nucleoproteine klären. Battelli und Stern fanden, daß die „Grenzkonzentration“ beinahe dieselbe Konzentration war, die völlige Lähmung des Succinicoydons bewirkt. In dem vorliegenden Beispiel entspricht sie fast der Lösung, die die Indophenoloxydase inaktiviert.

Eine Anzahl anderer Versuche mit Leberaufschwemmung ergab sehr ähnliche Resultate. Es wurden Emulsionen mit 6 Teilen Wasser und solche mit $1\frac{1}{2}$ Teilen bereitet. Beide Arten lieferten die gleichen und kritischen Grenzkonzentrationen wie die im Verhältnis 1:3 hergestellten, obgleich die Konzentration mit maximalem Effekt in bezug auf das gebildete Präcipitat nicht dieselbe war. Sie betrug 7,2 m-Alkohol in der Emulsion 1: $1\frac{1}{2}$, 8,2 m in der mit 3 Wasserteilen und 10,3 m in der mit 6 verdünnten. Die wirklich gewonnenen Niederschlagsmengen waren 3,1 ccm, 2,2 ccm und 1,8 ccm, also gar nicht der in der Lösung enthaltenen Nucleoproteinmenge direkt proportional. Bei einer Emulsion von 1:3, die vor Gebrauch 24 Stunden lang unberührt blieb, und einer ebensolchen, deren Leber 24 Stunden vor Herstellung der Emulsion intakt gelassen wurde, konstatierte man in beiden Fällen eine kritische Konzentration von 4,6 m anstatt 5,6, und eine Grenzkonzentration von 6,3 m anstatt 9,2. Wahrscheinlich war die leichtere Fällbarkeit der Proteine aus diesen Aufschwemmungen durch postmortale Säurebildung bedingt.

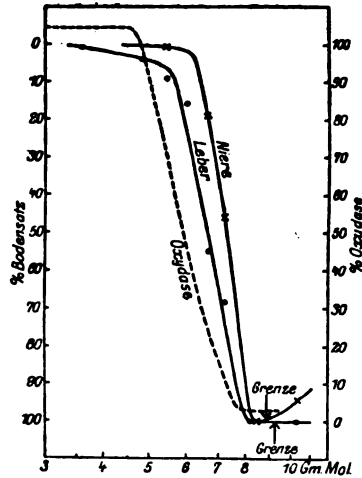


Fig. 1. Äthylalkohol.

Die Acetonfällungskurve von Leberemulsion stand nur in mäßigem Einklang mit den Oxydasekurven, wie sich aus Fig. 2 ergibt. So lag hier die kritische Konzentration bei 3,0 m, während Oxydase erst bei 4,0 m zerstört wird. Die Grenzkonzentration war 4,2 m, also ganz abweichend von derjenigen, die Oxydase abtötet, nämlich 7,0 m. Bei ansteigenden Konzentrationen von Aceton wuchs auch anfangs die ausgefällte Niederschlagsmenge, um dann bedeutend abzunehmen.

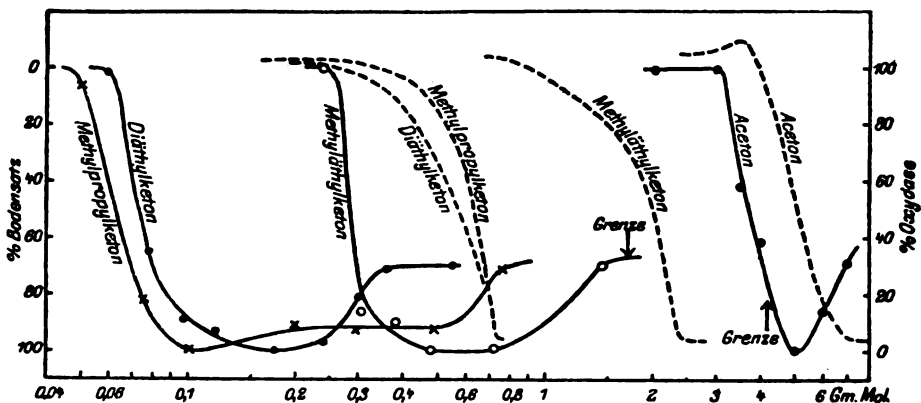


Fig. 2.

Beim Übergang zu den höheren Ketonen fehlt jede Spur eines Parallelismus zwischen Nucleoproteinfällung und Oxydasenlähmung. Methyläthylketon setzte bei 0,24 m mit der Wirkung ein, erzeugte die Maximalfällung bei 0,48 m. Seine Grenzkonzentration lag bei 1,7 m, während die Anfangswirkung auf die Oxydase bei 0,9 m und bei 2,4 m die völlige Vernichtung des Enzyms eintrat. Die durch Methylpropylketon und Diäthylketon bedingten Fällungskurven der Leberaufschwemmung harmonieren sehr gut miteinander, ebenso wie es für die Kurven der Oxydasenzerstörung für diese beiden Stoffe der Fall ist. Doch ist die Disparität zwischen Fällung und Oxydasenvernichtung hier noch größer als bei Methyläthylketon. Die Werte für die kritische Konzentration sind nach meinen Erhebungen für Methyläthylketon und Methylpropylketon (0,24 m und 0,045 m), gänzlich von denjenigen in Battelli und Sterns Versuchen (1,64 m und $> 0,7$ m) verschieden. Den Grund dafür kann ich nicht angeben. Selbst die Möglichkeit, daß diese Abweichungen

durch Beimengungen in den von mir benutzten Ketonproben bedingt sein könnten, fällt hier weg, da ich in meinen Oxydase- wie in den Fällungsversuchen mit genau denselben Ketonproben gearbeitet habe.

Die mit Äthylurethan erzielten Ergebnisse sind in Fig. 3 verzeichnet. Die kritische Konzentration dieses Narkoticums, sowohl für Leber- und Nierenextrakte, ist fast doppelt so groß wie die auf Oxydase zuerst einwirkende; auch zwischen der Grenzkonzentration und der zur vollständigen Oxydasenhemmung erforderlichen besteht dasselbe Verhältnis. Die Fällungskurve von Leberaufschwemmung zeichnet sich durch eine sonder-

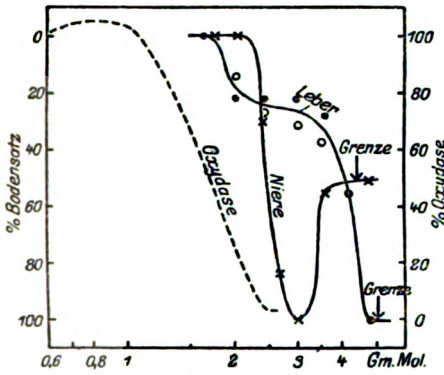


Fig. 3. Äthylurethan.

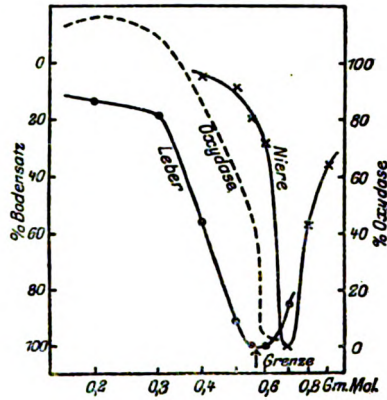


Fig. 4. Chloralhydrat.

bar unregelmäßige Gestalt aus. Worauf das beruht, ist uns nicht bekannt, wenn auch die Gültigkeit des Resultats nicht angezweifelt werden kann. Der Versuch wurde zweimal mit verschiedenen Leberemulsionen und verschiedenen Urethanproben wiederholt, doch blieb das Ergebnis praktisch dasselbe. Die beiden Reihen von Werten sind in der Figur eingesetzt.

Fig. 4 verbildlicht die Ergebnisse mit Chloralhydrat. Aus ihnen geht hervor, daß die Gewebsproteine der Leberaufschwemmung in viel höherem Grade ausgefällt werden als aus Nierenextrakt. Keine der Fällungskurven entspricht befriedigend derjenigen der Oxydasenzerstörung. Die Parallelität war in einem anderen, mit einem Leberauszug, 1 zu $1\frac{1}{2}$, ausgeführten Versuch größer. Die Grenzkonzentration des Leberauszugs stimmte ziemlich gut mit der zur gänzlichen Inaktivierung der Oxydase

nötigen überein, doch lieferte Nierenemulsion selbst mit 0,9 m-Chloralhydrat keine klare Lösung. Im ganzen fügen sich jedoch die mit Chloralhydrat erlangten Resultate gut in die von Battelli und Stern aufgestellte Hypothese ein.

In krassem Widerspruch zu letzteren zeugen die Befunde mit Phenol nicht nur gegen diese Annahme, sondern bringen auch eklatant zum Ausdruck, was für ein komplizierter Vorgang die Fällung von Gewebsauszügen ist. Eine verhältnismäßig geringe Modifikation im Charakter der Lösung kann eine radikale Veränderung ihrer Fällungskurve zur Folge haben. Aus Fig. 5 ersehen wir, daß eine bedeutende Fällung in der

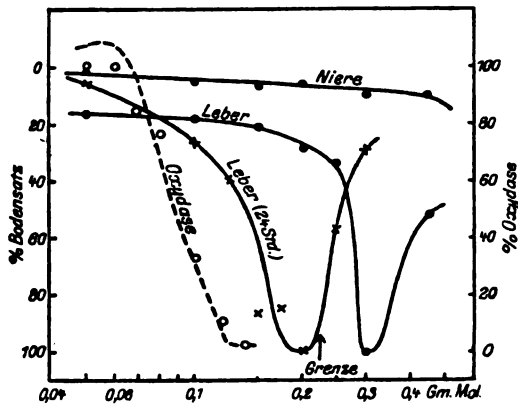


Fig. 5. Phenol.

Leberaufschwemmung erst bei einer 0,25 m-Konzentration eintritt, während die Oxydationskraft der Gewebe schon durch 0,067 m-Phenol beeinträchtigt wird. Ein anderer Versuch, bei dem ein Auszug mit 3 Wasserteilen in 0,9%iger Salzlösung verwandt wurde, lieferte eine schärfer gekrümmte Kurve mit einer kritischen Konzentration von 0,2 m. Hingegen war der Niederschlag einer Emulsion, deren Leber 24 Stunden bei 15° vor der Aufschwemmung aufbewahrt wurde, gänzlich verschieden, so daß sowohl die Gestalt wie auch die Lage der Fällungskurve sich änderte. In einem anderen Fall blieb die Lösung vor Gebrauch 24 Stunden stehen. Die diesbezügliche Kurve verlief ähnlich, obgleich die fallende Wirkung jäh, schon bei einer Konzentration von 0,12 m einsetzte. Diese frappanten Verschiedenheiten in den Fällungsergebnissen

sind immer bemerkenswerter, wenn man sie mit den Werten der Oxydasevernichtung vergleicht. Diese erleiden keine wesentliche Veränderung, wenn die Niere vor ihrer Verwendung lagert. Die in der Figur gezeichnete, einer früheren Veröffentlichung entnommene Kurve stellt die Oxydasenlähmung von frischer Niere dar. Die mitgeteilten Versuchsergebnisse beziehen sich auf Niere, die fein zerkleinert 24 Stunden aufgehoben wurde, ehe sie auf ihre Oxydase geprüft wurde. Die postmortalen Veränderungen in zerkleinertem Gewebe sind zwar bedeutend größer als in intaktem, beeinflussen aber doch nicht die Oxydasetätigkeit, während die unbearbeitete, 24 Stunden lang aufbewahrte Leber eine solch ausgesprochene Wirkung auf den Niederschlag der daraus bereiteten Emulsion ausübte.

Die Nierenaufschwemmung lieferte mit Phenol sehr abnorme Resultate. Konzentrationen bis 0,45 m hatten fast gar kein Fällungsvermögen, die maximale Menge des Niederschlags betrug nur 0,19 ccm. Nach Zusatz von überschüssigen Phenolkristallen bildete sich ein reichliches Präcipitat (1,9 ccm). Die Fällungswerte in der Figur sind Prozente der damals beobachteten Niederschlagsmenge. Die Grenzkonzentration wurde überhaupt nicht erreicht, sogar nicht bei Gegenwart von Phenolkristallen im Überschuß. Ebenso wenig in dem Versuch mit frischer Leberemulsion. Der Leberauszug in Salzlösung wies dagegen eine Grenzkonzentration von 0,6 m auf, die 24 Stunden lang unbenutzte Emulsion von 0,19 m und diejenige der 24 Stunden lang intakt gelassenen Leber von 0,22 m. Selbst zwischen diesen Werten und der die Oxydase ganz zerstörenden Phenolkonzentration (0,12 m) kann man keine Parallele ziehen.

Erwähnt seien noch Versuche mit Leberaufschwemmung und verschiedenen Konzentrationen von Isoamylalkohol, auch mit überschüssigem Alkohol, sogar was die zur Lösung nötige Menge betrifft. In keinem Fall wurde auch nur eine Spur von Niederschlag gebildet. Bei der Oxydase dagegen beginnt der Alkohol bei einer Konzentration von 0,12 m einzuwirken und zerstört 81% des Enzyms, wenn die Lösung gesättigt, d. h. 0,28 m beträgt.

Wir sehen also, daß eine Analogie zwischen Nucleoprotein-fällung und Oxydasenzerstörung zwar für Äthylalkohol be-

steht, dagegen für Aceton und Chloralhydrat nur in geringem Grade und gar nicht für die anderen untersuchten Anaesthetica. Folglich ist es ein reiner Zufall, wenn eine solche in die Erscheinung tritt und kommt als Alternative für die Lipoidhypothese der Oxydasenlähmung durchaus nicht in Betracht.

Das Auseinandergehen von Fällbarkeit und Oxydasever-
nichtung wird noch weiter bewiesen durch das von den ver-
schiedenen Narkoticis ausgefällte Niederschlagsvolumen. Aus
der Tabelle geht hervor, daß, während Äthylalkohol das Maxi-
mum, nämlich einen Bodensatz von 2,2 ccm aus der Leber-
emulsion niederschlägt, bei den anderen Narkoticis die Menge
annähernd proportional zu ihrer kritischen Konzentration

	Kritische Konz. von Leber- emulsion (Vernon)	Kritische Konz. von Muskel- emulsion (Battelli u. Stern)	Volumen d. gefällt. Bodensatzes aus Leber- emulsion ccm	Kritische Konz. von Nieren- emulsion (Vernon)	Volumen d. gefällt. Bodensatzes aus Nieren- emulsion ccm
Äthylalkohol . . .	m-5,0	m-6,1	2,2	m-6,1	2,6
Aceton	3,0	2,9	2,0	—	—
Äthylurethan . . .	1,8	1,8	1,8	2,1	1,6
Chloralhydrat . . .	0,31	0,33	1,6	0,45	1,6
Methyläthylketon .	0,24	1,6	1,6	—	—
Diäthylketon . . .	0,06	—	1,4	—	—
Methylpropylketon	0,045	> 0,70	0,95	—	—
Phenol	0,25	0,22	0,39	> 0,30	(0,19)

immer geringer wird. Am Ende der Reihe stehen Methyl-
propylketon mit einem Volumen von 0,95 ccm und Phenol
mit nur 0,39 ccm. Unter leicht modifizierten Bedingungen
präcipitiert Phenol jedoch fast so viel wie die anderen Nar-
kotica. Wird der Leberauszug mit normaler Salzlösung her-
gestellt, so beträgt der Bodensatz 1,7 ccm, und 2,2 ccm bei
einer 24 Stunden alten. Aus einer Aufschwemmung, wo die
Leber erst 24 Stunden lang vor Bereitung der Lösung aufbe-
wahrt wurde, fällt Phenol 1,0 ccm aus.

Die Niederschlagsmengen aus einer Nierenlösung im Ver-
hältnis 1:4 weisen sogar noch größere Schwankungen auf als
diejenigen aus Leberemulsion.

Die zerstörende Wirkung der Narkotica auf Oxydase im Verhältnis zur Temperatur.

Um für meine Hypothese der Abhängigkeit der Oxydasenwirkung von Lipoiden noch weitere beweiskräftige Belege zu erbringen, habe ich andere, jetzt zu beschreibende Versuchsreihen ausgeführt.

Einer der stärksten, von Hans Meyer¹⁾ ins Feld geführten Beweise für die Lipoidtheorie der Narkose ist die grobe Übereinstimmung zwischen narkotisierenden Konzentrationen und Teilungskoeffizienten bei verschiedenen Temperaturen. Meyer hat nachgewiesen, daß, während Äthylalkohol und Aceton fast doppelt so löslich in Öl bei 36° als bei 3° sind, ihre narkotisierenden Konzentrationen für Kaulquappen bei der höheren Temperatur nur die Hälfte von der bei der niedrigeren betragen. Andererseits waren Salicylamid und Benzamid noch einmal so löslich in Öl bei 3° als bei 36°, ihre Konzentrationen mit narkotischer Wirkung dagegen bei 3° nur halb so groß als bei 36°. Wenn die Wirksamkeit der Indophenoloxydase de facto an Lipoiden gebunden ist, so muß sie durch diese Narkotica bei wechselnden Temperaturen in analoger Weise beeinflußt werden. Daß dem wirklich so ist, dafür haben Battelli und Stern in ihren Succinicoxydonversuchen einiges Beweismaterial gewonnen. Sie haben die Wirkung von Äthylalkohol, Aceton und anderer Narkotica auf das Oxydon bei 15° und 40° geprüft und dabei konstatiert, daß die Konzentrationen mit Anfangswirkung in jedem Fall bei ersterer Temperatur höhere waren als bei letzterer, meistens doppelt so groß. Sie haben es aber unterlassen, diejenigen Substanzen, die nach Meyers Befunden den entgegengesetzten Effekt bei Wechsel der Temperatur zeigen, in den Bereich ihrer Untersuchung zu ziehen.

Battelli und Stern stellten fest, daß die Fällungskraft der Narkotica Aufschwemmungen gegenüber durch die Temperatur in demselben Maße wie die Zerstörungskraft für Oxydon beeinträchtigt wird, d. h. daß das Verhältnis der kritischen Konzentration zur oxydonzerstörenden bei 15° etwa dasselbe wie bei 40° ist. Überall trifft das jedoch nicht ganz genau zu.

¹⁾ H. Meyer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 46, 338, 1901.

So war das Verhältnis zwischen beiden für Äthylalkohol 1,24 bei 15° und 0,88 bei 40°, für Aceton 0,66 bei 15° und 1,02 bei 40°. Bei Phenol: 3,67 bei 15° und 2,00 bei 40°.

In meinen Versuchen habe ich die Einwirkung verschiedener Anaesthetica bei 1° und 36° studiert. In den Versuchen bei 1° wurde eine abgewogene Menge frisch zerhackter Niere in eine kleine Flasche unter Verschuß gebracht, in einer Mischung von Eis und Wasser $\frac{1}{2}$ Stunde lang aufbewahrt; eben dort und ebenso lange auch die narkotische Salzlösung. Nach schnellem Durchschütteln der beiden Ingredienzen wurde die Flasche wieder auf 2 Stunden in das Eis gestellt.

Die zerriebene Niere wurde dann mit frischer Salzlösung zur Entfernung des Narkoticums ausgewaschen und ihre Oxydationskraft in der üblichen Weise bestimmt. Bei Versuchen bei Zimmertemperatur (17°) ließ man das Narkoticum $\frac{1}{2}$ Stunde lang auf die zerkleinerte Niere einwirken im Hinblick auf die schon eruierte Tatsache¹⁾, daß nach 2 oder sogar $3\frac{1}{2}$ Stunden die Ergebnisse bei Äthylalkohol nur wenig abweichende waren. Es kann jedoch kein Zweifel darüber herrschen, daß die Zeit des Eindringens eines Narkoticums in das zerhackte Gewebe und folglich seine Wirkung auf die Oxydase durch die Temperatur beeinflußt wird. Wahrscheinlich verdoppelt sie sich mit jeder Steigerung um 10°. Um nun einwandfreie vergleichbare Resultate zu erlangen, beschränkte man die Einwirkung der narkotischen Lösung auf nur 8 Minuten bei 36° im Gegensatz zu 30 Minuten bei 17° und dehnte sie auf 2 Stunden bei 1° aus. Die ausgezogenen Kurven in Fig. 6 zeigen die zerstörende Tätigkeit von Äthylalkohol unter solchen Bedingungen. Bei 1° ist die Gestalt der Kurve fast dieselbe wie bei 17°, obgleich die Konzentration des Alkohols, die die Oxydase zu schädigen beginnt, dann erheblich größer ist (6,3 m gegenüber 4,8 m). Bei 36° setzte diese hemmende Wirkung schon bei einer Konzentration von 2,2 m ein, doch weist die Kurve der Oxydasenzerstörung bei 3,9 m eine scharfe Krümmung auf, so daß wohl diese Konzentration mit den eben genannten Werten bei 17° und 1° verglichen werden

¹⁾ Vernon, diese Zeitschr. 51, 8, 1913.

müßte. Es ist jedoch für einen Vergleich der Alkoholeinwirkungen bei verschiedenen Temperaturen einfacher, mit den Konzentrationen, die 50% der Oxydase zerstören, rechnerisch zu operieren. Dies ist in der nachstehenden Tabelle gesehen.

Die erste punktierte Kurve in der Figur veranschaulicht die 30 Minuten andauernde Alkoholwirkung bei 36°. Es ergibt sich daraus, daß die Menge zerstörenden Enzyms viel größer als in dem 8-Minuten-Versuch war. Außerdem ist bemerkenswert, daß der Kurve der typische scharfe Knick fehlt, was wahrscheinlich auf der äußerst großen Empfindlichkeit der

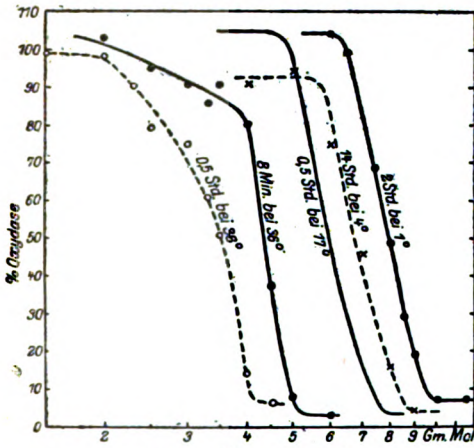


Fig. 6. Äthylalkohol.

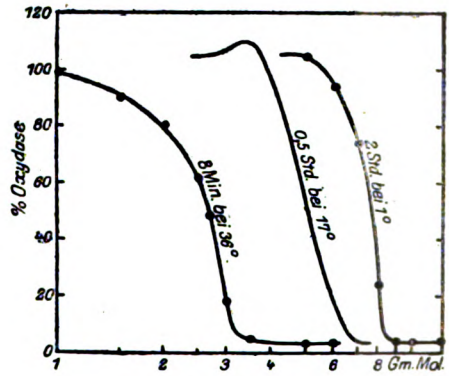


Fig. 7. Aceton.

Oxydase gegen hohe Temperaturen beruht. Behandlung der Niere 14 Stunden lang bei etwa 4° anstatt 2 Stunden bei 1° verursachte fast dieselbe Intensität der Wirkung, wie es bei 3¹/₂ stündiger Einwirkung bei 17° anstatt 1¹/₂ stündiger konstatiert worden war.

Fig. 7 stellt graphisch die zerstörende Wirkung von Aceton bei 8 Minuten Dauer und 36°, 30 Minuten und 17° und 2 Stunden bei 1° dar. Im Vergleich zu den entsprechenden Äthylalkoholkurven bewirkte das Aceton relativ größere Schädigung bei 36°. Chloralhydrat ließ man analog in bezug auf Dauer und Temperatur einwirken. Die Kurven mit den Ergebnissen bei 36° und 1° zeigten große Ähnlichkeit mit denen bei 17°. Da sie schon in einer bereits veröffentlichten Arbeit

aufgezeichnet sind, erübrigt sich eine nochmalige Reproduktion an dieser Stelle.

Von der anderen Gruppe der Meyerschen Narkotica, die bei 3° stärker als bei 36° narkotisieren, waren 2 der 3 für Oxydaseexperimente nicht zu gebrauchen. Salicylamid ist nicht löslich genug, Monoacetin dagegen versagt überhaupt, selbst in 50%iger Lösung, Oxydase gegenüber. Die höchste herstellbare Konzentration von Benzamid, nämlich 0,16 m, zerstörte 34% der Nierenoxydase nach 8 Minuten Einwirkung bei 36°, der erste Angriff erfolgte bei 0,134 m. Dem Verlaufe der Kurve nach zu schließen, würden 50% bei einer Konzentration von 0,168 m vernichtet worden sein. Bei 17° ist Benzamid weniger löslich als bei 36°, und eine gesättigte Lösung enthält bei Zimmertemperatur nur 0,13 m. Diese Konzentration war auf die Oxydase wirkungslos, ebenso eine schwach übersättigte Lösung von 0,14 m, doch krystallisierte etwas Benzamid daraus vor Ende der halben Stunde aus. Wurde eine 0,15 m-Lösung mit zerkleinerter Niere bei 21° vermischt, so begann das Benzamid bei Abkühlung des Reaktionsgemisches auf Zimmertemperatur in 2 oder 3 Minuten auszukrystallisieren. Doch hatte es in der halben Stunde 10% der Oxydase vernichtet gegen 25% in dem Versuch bei 36°. Da die Gesamtmenge des Benzamids nur so kurze Zeit zur Einwirkung gelangt war, ist es möglich, daß der Angriff des Benzamids auf das Enzym bei 17° fast so heftig wie bei 36° ist, jedenfalls nicht stärker bei der niedrigeren Temperatur als bei der höheren, wie man auf Grund von Meyers Resultaten erwarten würde.

Die zur Zerstörung von 50% der Oxydase erforderlichen Konzentrationen sind in der Tabelle zusammengestellt, wie auch ihr Verhältnis zu Meyers Narkosewerten. Wie man sieht, ist dieses ziemlich konstant mit Ausnahme desjenigen für Chloralhydrat bei 36°.

	50% der Oxydase zerstörenden Konzentration		Narkotisierende Konzentration		Oxydasekonz. Narkosekonz.	
	1°	36°	3°	36°	1°	36°
Äthylalkohol . .	m-8,0	m-4,4	0,33	0,14	24	31
Aceton	7,6	2,7	0,33	0,14	23	19
Chloralhydrat .	0,67	0,33	0,02	0,004	33	82
Benzamid . . .	—	0,168	0,002	0,005	—	34

Overton¹⁾ hat schon darauf aufmerksam gemacht, daß dieses Narkoticum insofern eine Ausnahmestellung einnimmt, als es langer Zeit, sogar Stunden, bedarf, um ins Gleichgewicht zu kommen. Daher ist es schwierig, seine wirkliche narkotisierende Konzentration zu bestimmen und vergleichbare Werte bei verschiedenen Temperaturen zu erlangen.

Mit Wachstum einhergehende Veränderungen in der Oxydase-reaktion auf Narkotica.

Vor kurzem habe ich festgestellt²⁾, daß Kaulquappen während ihres Wachstums- und Entwicklungsprozesses beträchtliche Veränderungen in ihrem Verhalten Narkoticis gegenüber aufweisen. So bedingen neu ausgebrütete Kaulquappen fast eine doppelt so starke Konzentration von Methyl- und Äthylalkohol zu ihrer Narkotisierung als 40 Tage alte Tiere, und nur eine halb so starke von Heptyl- und Octylalkohol. Diese Ausschläge sind, zum Teil wenigstens, von Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellipoide abhängig. So stimmen Raske³⁾, Koch und Mann⁴⁾ und L. Smith und Mair⁵⁾ alle dahin überein, daß die vorhandene Menge Cerebrin im Gehirn von Säugetieren während des Wachstums zunimmt. Wenn die Wirksamkeit der Geweboxydasen wirklich mit diesen Lipoiden in engem Zusammenhang steht, so ist die Vermutung nicht unberechtigt, daß sie sich mit steigendem Alter den Narkoticis gegenüber anders verhalten. Um diesen Punkt aufzuklären, wurden Proben von Niere, Leber, Gehirn und Herz, in zerkleinertem Zustande, von Ratten verschiedenen Alters der Einwirkung einer Kochsalzlösung mit 6,0 m-Äthylalkoholgehalt $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur ausgesetzt. Der Oxydasegehalt wurde dann wie üblich bestimmt. Die fein zerhackten, mit Substrat vermischten Gewebe verblieben während der Oxydation im Dunkeln, da die Spontanoxydation dadurch wesentlich herabgesetzt wird. Es stellte sich heraus, daß man am zweckmäßigsten diese Eigenoxydation nicht in Abzug bringt, sondern

¹⁾ Overton, Studien über die Narkose. Jena 1901.

²⁾ Vernon, Journ. of Physiol. 47, 15, 1918.

³⁾ Raske, Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 336, 1886.

⁴⁾ Koch und Mann, Journ. of Physiol. XXXVI, 36, 1907.

⁵⁾ L. Smith und Mair, Journ. of Pathol. 16, 131, 1911; 17, 123, 1912.

die Gesamtmenge des gebildeten Indophenols in Prozenten der im mit Kochsalzlösung + Gewebe allein angesetzten Kontrollversuch gefundenen Gesamtmenge berechnet. Das Gewicht neugeborener Ratten ist so gering, daß sogar 7 Stück eine Ausbeute von nur 0,18 g Herzmuskel und 0,30 g Niere lieferten. Doch ist es bei Verwendung von kleinen Petrischalen und einer entsprechend kleineren Substratmenge möglich, die Oxydase mit einiger Genauigkeit festzustellen.

Aus der Tabelle erhellt, daß, während Äthylalkohol die Nierenoxydase von 1 und 1 $\frac{1}{2}$ Tage alten Ratten vollständig bis auf 9 bis 12 $\frac{0}{10}$ zerstörte, seine Einwirkung auf diejenige von 14 g schweren Ratten (ihr Alter ist unbekannt) eine viel gelindere war und bei ausgewachsenen Tieren weniger als die Hälfte vernichtete.

	1 Tag alte Ratten (5,2 g)	2 $\frac{1}{2}$ Tage alte Ratten (5,4 g)	Ratten, 14 g schwer	Ausgewachsene Ratten (245 g)
	$\frac{0}{10}$	$\frac{0}{10}$	$\frac{0}{10}$	$\frac{0}{10}$
Niere	12	9	29	54
Leber	32	37	49	48
Gehirn	38	43	50	60
Herz	31	42	41	41

Die Leber- und Gehirnoxydase wies nicht so auffallende Reaktionsveränderungen wie diese auf, doch war der Oxydasengehalt der Gewebe nach Alkoholbehandlung von ausgewachsenen Tieren fast 50 $\frac{0}{10}$ größer als derjenige von eben geworfenen Ratten. Am wenigsten wurde die Oxydase des Herzmuskels angegriffen, denn bei allen Tieren, ausgenommen bei den neugeborenen, war die gegenwärtige Menge so gut wie konstant.

Wahrscheinlich beruhen diese bedeutenden Unterschiede in der Reaktion der Oxydase in gewissem Grade auf der Tatsache, daß die Gewebe der jungen Ratten weniger zäh und für Alkohol mehr durchlässig sind als von alten. Da der Herzmuskel schon viele Tage intrafötal Arbeit zu verrichten hat, ist er natürlich von festerer Beschaffenheit als die Niere, die in dieser vitalen Periode noch sehr wenig in Aktion ist. In einer früheren Versuchsreihe habe ich jedoch gefunden, daß Kaninchenniere nach 3 $\frac{1}{2}$ stündiger Behandlung mit 6 m-Alkohol 27 $\frac{0}{10}$ ihrer Oxydase behauptet gegenüber 47 $\frac{0}{10}$ nach $\frac{1}{2}$ stündiger Einwirkung. So können also die bei der Reaktion

von Nierenoxydase auf Alkohol während des Wachstums beobachteten großen Ausschläge wohl nur zum kleinsten Teil durch Differenzen in dem physikalischen Zustande des Gewebes gedeutet werden. Die einleuchtendste und zugleich treffendste Erklärung gewährt unsere Annahme, daß sie vielmehr von Änderungen in der Zusammensetzung der Gewebslipoide abhängen, mit denen die Aktivität der Oxydase verknüpft ist.

Beziehung zwischen Oxydasewerten und narkotisierenden Konzentrationen.

In schon mitgeteilten Arbeiten habe ich dargelegt, daß zwischen den die Nierenoxydase angreifenden narkotischen Konzentrationen und denjenigen nach Overton zur Narkose von Kaulquappen erforderlichen eine ziemlich nahe Beziehung besteht. Meine Bestimmungen an Kaulquappen von bekanntem Alter, die ich meinerseits¹⁾ unlängst ausgeführt habe, nähern sich nun noch mehr den Oxydasezahlen als die von Overton angegebenen. In der nachstehenden Tabelle sind die an Kaulquappen von 17 bis 22 Tagen ermittelten narkotisierenden Konzentrationen zusammengestellt. Nur beim Paraldehyd stammen die etwas höheren und besser sich einfügenden Zahlen aus Versuchen mit 78 Tage alten Tieren. Die Oxydasewerte

	Auf d. Oxydase einwirkende Konzentration	Narkotisierende Konzentration	Oxydasekonz. Narkosekonz.
Methylalkohol	m-10,5	m-0,98	11
Äthylalkohol	4,8	0,46	10
Propylalkohol	1,5	0,10	15
Butylalkohol	0,32	0,0215	15
Isoamylalkohol	0,12	0,0084	14
Heptylalkohol	0,0065	0,00028	23
Allylalkohol	2,0	0,13	15
Aceton	4,0	0,28	14
Methyläthylketon	0,9	0,082	11
Methylpropylketon	0,32	0,021	15
Methylurethan	2,0	0,30	7
Äthylurethan	1,1	0,035	31
Propylurethan	0,29	0,0066	44
Äther	0,5	0,032	16
Chloroform	0,0145	0,0013	11
Chloralhydrat	0,32	0,034	9
Paraldehyd	0,6	0,022	27
Nitromethan	0,7	0,112	6

¹⁾ Vernon, Journ. of Physiol. 47, 15, 1913.

sind aus den Arbeiten älteren Datums zitiert, außer für Allylalkohol. Dieser hatte nämlich eine sehr geringe Einwirkungskraft auf die Oxydase bis zu einer Konzentration von 2,0 m. Dann erst entwickelte sie sich plötzlich zu einer intensiven Aktivität, und deshalb wird diese Konzentration als wahrer Einwirkungsanfang angenommen.

Die Werte schwanken also im Bereich von 6 und 44, doch halten sich 12 aus 18 zwischen 9 und 16, sind also mit hin ziemlich konstant. Betrachten wir die homologe Reihe zuerst, so sehen wir, daß 5 von den 6 Gliedern der Methylalkoholreihe Werte zwischen 10 und 15 ergeben. Wir haben also hier eine viel größere Konstanz vor uns als beim Vergleich der Oxydasewerte mit den Overtonschen narkotisierenden Konzentrationen, denn dort variieren die Verhältniszahlen zwischen 18 und 5. Die 3 Glieder der Ketonreihe weisen ein nahezu konstantes Verhältnis auf, nur die Urethane fallen sichtlich aus der Reihe. Der mit Methylurethan gefundene Wert ist niedriger als der normale, während diejenigen für Äthyl- und Propylurethan höher als die normalen sind. Von den anderen Narkoticiis lieferte Nitromethan einen sehr niedrigen Quotienten. Rechnet man aber mit Overtons Wert anstatt mit meinem, so ergibt sich 9, eine wenig von der Norm abweichende Zahl. Auch Overtons Wert für Paraldehyd (24) paßt etwas besser als der meinige. Die anderen untersuchten Narkotica ergaben beinahe konstante Zahlen.

Es kann also wenig Zweifel darüber bestehen, daß der Angriff der Narkotica, ebenso wie ihre Einwirkung auf lebende Organismen durch die Vermittlung von Lipoiden zustande kommt, auch auf die Indophenoloxydase auf demselben Wege erfolgt. Über den Modus ihres Angriffs auf die Lipide bei der Narkose, den Umfang ihrer gleichzeitigen Wirkung auf die Proteinbestandteile der Zelle dabei¹⁾, sind wir noch nicht genau orientiert. Der allgemeinen Ansicht zufolge müssen sie sich erst in den Lipoiden im Verhältnis ihres Teilungskoeffizienten auflösen, wobei nicht vergessen werden darf, daß diese Lipide aller Wahrscheinlichkeit nach nicht nur eine Plasmahaut um die Zelle, sondern auch zahlreiche intracelluläre Membranen bilden.

¹⁾ Vgl. Moore und Roaf, Proc. Roy. Soc. 73, 382, 1904; 77, 86, 1906.

Nach Auflösung der Narkotica in diesen Membranen gehen die letzteren sicherlich in einen veränderten physikalischen Zustand über, denn Loewe¹⁾ hat erst vor kurzem gezeigt, daß künstliche Lipoidmembranen, die man mit Chloroform, Äther oder Alkohol behandelt, eine ausgesprochene Abnahme in der elektrischen Leitfähigkeit aufweisen. Außerdem werden die Narkotica in enge Beziehung zu den kolloidalen Partikeln der Enzyme und anderer Substanzen innerhalb der Zelle gebracht, auf die sie vermutlich einen direkten Einfluß ausüben²⁾.

Zusammenfassung.

Die von Battelli und Stern gefundene Übereinstimmung zwischen den das „Succinicoxydon“ der Gewebe vernichtenden Konzentrationen verschiedener Narkotica und denjenigen, die die Nucleoproteine aus ihren Aufschwemmungen fällen, gilt nicht für die Indophenoloxydase im allgemeinen. Obgleich ein Parallelismus bei Äthylalkohol und in mäßigem Grade bei Chloralhydrat und Aceton beobachtet wurde, so beträgt die Nucleoprotein fällende Konzentration von Methyläthylketon nur $\frac{1}{4}$ der oxydasezerstörenden, bei Methylpropylketon sogar nur $\frac{1}{7}$. Andererseits ist diejenige von Äthylurethan fast 2 mal so groß, und von Phenol beträgt sie sogar das Vierfache. Weiter ist zu berücksichtigen, daß die Fällbarkeit von Gewebsaufschwemmungen ein außerordentlich variabler Faktor ist. Das Volumen des gebildeten Niederschlags nimmt stetig ab beim Übergang von Narkotica, die erst in hohen Konzentrationen ihre Wirkung entfalten, zu denen in niedrigen. Die Fällbarkeit von Leberaufschwemmungen ist nicht mit derjenigen von Nierenaufschwemmungen identisch. Wird die Leber 24 Stunden lang vor der Bearbeitung aufbewahrt, so kann dadurch die Niederschlagsbildung gänzlich verändert werden. Auf Grund dieser Tatsachen wird gefolgert, daß die Übereinstimmung zwischen durch Narkotica bewirkte Nucleoproteinfällung und Oxydasenzerstörung im günstigsten Falle nur eine zufällige ist. Wir erblicken in ihr keine Erklärung, die an die Stelle der von uns aufgestellten Hypothese treten kann, daß die Wirkung der Indophenoloxydase von Lipoiden abhängt.

¹⁾ S. Loewe, diese Zeitschr. 57, 161, 1913.

²⁾ Vgl. Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. 153, 276, 1913.

Zur weiteren Stütze dieser Annahme können wir mitteilen, daß die Beziehung zwischen den die Oxydase schädigenden narkotischen Konzentrationen und den nach neuen Bestimmungen des Verfassers ermittelten narkotisierenden Grenzwerten für Kaulquappen eine viel engere ist als bei Verwendung der älteren Overtonschen Zahlen. Schaltet man die Urethane aus, die aus der Reihe fallen, so lieferten die anderen 15 untersuchten Narkotica Quotienten zwischen 9 und 24.

Ferner ist konstatiert worden, daß die bei 36° auf die Oxydase einwirkenden Konzentrationen von Äthylalkohol, Aceton und Chloralhydrat nur halb so stark sind wie die entsprechenden bei 1°. Dieser Befund steht also im Einklang mit H. Meyers Angabe, daß ihre narkotisierenden Konzentrationen dann etwa nur die Hälfte betragen. Dagegen greift Benzamid, das bei 3° eine stärkere narkotische Wirkung ausübt als bei 36°, die Oxydase in beinahe demselben Maße bei 17° wie bei 36° an.

Die Gewebsoxydase ändert sich je nach der Wachstumsstufe bemerkenswert in ihrem Verhalten Narkoticis gegenüber. So zerstörte Äthylalkohol von 6 m 90% der Oxydase aus Niere von neugeborenen Ratten, aber nur 46% von ausgewachsenen. Dieser markante Unterschied trat aber bei der Oxydase von Herzmuskel nicht auf; die Schädigung zeigte sich fast unabhängig vom Alter der Ratten. Wahrscheinlich beruhen diese Unterschiede auf Änderungen in der Zusammensetzung der Zell-Lipoide während der Entwicklung der betreffenden Organe.

Über das Wesen der sogenannten Tyrosinasewirkung.

Von

A. Bach.

(Aus dem Privatlaboratorium des Verfassers in Genf.)

(Eingegangen am 2. Februar 1914.)

Bekanntlich nimmt die Tyrosinase eine Sonderstellung unter den Fermenten ein, indem sie dem Tyrosin gegenüber als eine streng spezifische Oxydase fungiert, während sie einige Phenole in ähnlicher Weise wie die Phenolase, die auf Tyrosin ohne jede Einwirkung ist, oxydiert. Zur Erklärung dieser mangelhaften Spezifität wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, die sich aber nicht als den Tatsachen entsprechend erwiesen. Im Anschluß an meine¹⁾ Versuche über das Koferment der Perhydridase und die hydroklastische Oxydation der α -Aminosäuren zu den nächstniederen Aldehyden unter gleichzeitiger Reduktion geeigneter Wasserstoffacceptoren (Streckerseche Reaktion) unternahm ich die rätselhafte Tyrosinasewirkung einer eingehenden Untersuchung. Da bei der Einwirkung der Tyrosinase auf Tyrosin Kohlensäure und Ammoniak, wie bei der Streckersechen Reaktion, abgespalten werden, so lag die Vermutung nahe, daß bei der Tyrosinasewirkung der Abbau des Tyrosins teils auf hydroklastischem Wege, teils durch die Vermittlung des freien Sauerstoffs herbeigeführt wird²⁾. Die Richtigkeit dieser Vermutung konnte ich völlig bestätigen: die Tyrosinase ist nicht eine einheitliche, spezifisch wirkende Oxydase, sondern ein Gemenge von gewöhnlicher Phenolase und

¹⁾ Diese Zeitschr. 38, 154, 1912; 52, 412; 58, 205, 1913.

²⁾ Vgl. A. Bach, Oxydationsprozesse in der lebenden Substanz. Oppenheimers Handb. d. Biochemie, Ergänzungsband. S. 178. Jena 1913.

einer Aminoacidase, durch deren Wirkung Tyrosin für die Oxydation durch Phenolase bzw. Peroxydase + Hydroperoxyd vorbereitet wird.

Im nachstehenden fasse ich die Ergebnisse meiner Untersuchung, die sich auf mehrere Jahre erstreckt hat, kurz zusammen. Auf das Geschichtliche der Tyrosinasefrage will ich hier nicht näher eingehen und verweise auf die Darstellung bei C. Oppenheimer¹⁾, sowie auf den Aufsatz von Battelli und Stern²⁾.

I. Die Tyrosinasewirkung umfaßt zwei voneinander zeitlich trennbare Prozesse: einen Oxydationsprozeß und einen Reduktionsprozeß.

Sämtliche Forscher, die sich mit der Tyrosinasefrage beschäftigt haben, stimmen dahin überein, daß Tyrosinase keine merkbare Einwirkung auf Tyrosin bei Sauerstoffausschluß ausübt. Daß aber bei der Tyrosinasewirkung neben dem Oxydationsprozeß ein ausgesprochener Reduktionsprozeß stattfindet, ist meines Wissens bisher nicht hervorgehoben worden. Der Reduktionsprozeß kann in folgender Weise veranschaulicht werden:

Bei der Einwirkung der Tyrosinase auf Tyrosin bei Luftzutritt entstehen bekanntlich rot gefärbte Oxydationsprodukte, die später eine rotbraune, dann violette Färbung annehmen und schließlich sich als schwarzer, in Alkalien, Säuren und organischen Lösungsmitteln unlöslicher Niederschlag abscheiden. Läßt man nun Tyrosinase auf Tyrosin an der Luft bis zu intensiver Rotfärbung einwirken und ersetzt dann im Reaktionsgefäß die Luft durch eine Stickstoff- oder Kohlendioxid-Atmosphäre, so erfolgt nach einiger Zeit vollständige Entfärbung des Reaktionsgemisches. Schüttelt man es wiederum an der Luft, so färbt es sich fast sofort rot. Führt man den Versuch bei 35 bis 40° aus, so kann man in kurzer Zeit die aufeinander folgende Reduktion und Oxydation demonstrieren. Daß die Reduktion des roten Oxydationsproduktes hier nicht etwa durch Bakterien bewirkt wird, geht daraus hervor, daß der Versuch mit gleichem Erfolg in 2%iger Natriumfluoridlösung, also unter völlig antiseptischen Bedingungen, ausgeführt werden kann.

Der gleiche Reduktionsprozeß findet auch bei der Einwirkung von Tyrosinase auf p-Kresol in Gegenwart von α -Aminosäuren statt. Chodat³⁾ und Abderhalden und Guggenheim⁴⁾ machten die für die Erkennt-

¹⁾ Die Fermente und ihre Wirkungen. 4. Aufl. Jena 1913.

²⁾ Die Oxydationsfermente. Ergebnisse der Physiologie 12, 96, 1912.

³⁾ Arch. sc. phys. natur. 32, 225, 1912.

⁴⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 331, 1908.

nis des Mechanismus der Farbstoffbildung in Pflanzen interessante Beobachtung, daß Gemische von p-Kresol und Aminosäuren durch Tyrosinase zu verschiedenartigen Farbstoffen oxydiert werden. So färbt sich z. B. ein Gemisch von p-Kresol und Glykokoll unter dem Einfluß der Tyrosinase allmählich intensiv weinrot, dann erfolgt spontan Entfärbung und die Flüssigkeit nimmt schließlich eine blaue bis blaurote Färbung an. Diese Entfärbung des zunächst entstehenden roten Oxydationsproduktes ist auf das Verdecken des Oxydationsprozesses durch den Reduktionsprozeß zurückführbar. Denn schüttelt man das farblos gewordene Gemisch an der Luft, so färbt es sich wiederum weinrot. Diese Operation kann mehrmals mit gleichem Erfolg wiederholt werden, vorausgesetzt, daß Glykokoll in ausreichender Menge vorhanden ist.

Da bei der Oxydation des Pyrogallols, des Hydrochinons usw. durch die Phenolase keine Reduktion der entstehenden gefärbten Oxydationsprodukte stattfindet, so ist das Auftreten des Reduktionsprozesses bei der Tyrosinasewirkung als eindeutiger Beweis dafür zu betrachten, daß bei der Einwirkung von Tyrosinase auf Tyrosin ein hydroklastischer Oxydo-Reduktionsprozeß ausgelöst wird.

II. Die Phenolase ist ein normaler Bestandteil der Tyrosinase.

Es ist leicht, Phenolasepräparate darzustellen, die auf Tyrosin ohne jede Einwirkung sind; völlig phenolasefreie Tyrosinasepräparate konnte ich trotz aller Bemühungen nie erzielen. Meine Fermentsammlung enthält 17 zu verschiedenen Zeiten und nach verschiedenen Methoden aus Pilzen (*Russula delica* und *Lactarius vellereus*) und Kartoffelschalen dargestellte Tyrosinasepräparate. Sämtliche Präparate oxydieren nicht nur Tyrosin, sondern auch mehr oder weniger Pyrogallol, Brenzcatechin und Hydrochinon.

Nach Bertrand¹⁾ kann man aus *Russula delica* völlig phenolasefreie Präparate erhalten, indem man die Pilze mit Chloroformwasser extrahiert und die Extrakte mit $1\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol versetzt. Der entstandene Niederschlag wird wiederum mit Chloroformwasser extrahiert und mit Alkohol gefällt. Das so dargestellte Präparat soll kräftig Tyrosin, nicht aber Pyrogallol und Hydrochinon oxydieren.

Diese Angabe kann ich nicht bestätigen. Wird Russulasaft der fraktionierten Fällung mit Alkohol in Gegenwart von Magnesiumsulfat unterworfen²⁾, wobei eine beliebige Anzahl von Fraktionen leicht und in kurzer Zeit erhalten werden kann, so enthalten sowohl die unteren als die oberen Fraktionen Tyrosinase und Phenolase. Ich habe die unteren

¹⁾ Compt. rend. 123, 460, 1886.

²⁾ A. Bach, Ber. 43, 362, 1910.

Fraktionen ($\frac{1}{2}$ bis $1\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol) wiederholt fraktioniert, konnte aber nicht die Trennung der Tyrosinase und der Phenolase erzielen. Zu bemerken ist hier allerdings, daß die oberen Fraktionen auf Guajac-Emulsion und Guajacol äußerst schwach oder gar nicht einwirken, während der ursprüngliche Russulasaft diese Substanzen kräftig oxydiert. Es handelt sich aber hier nicht um eine Ausschaltung der Phenolase, sondern lediglich um eine für die Oxydation dieser Substrate ungünstige Veränderung des Salzgehaltes der Präparate. Wie groß die Beeinflussung dieser Phenolasereaktionen durch den Salzgehalt des Reaktionsgemisches ist, geht aus folgendem Versuch hervor:

Man stellt 2% Guajacollösungen 1. mit reinem, destilliertem Wasser und 2. mit Wasser aus der Leitung dar. Fügt man beiden Lösungen gleiche Phenolasmengen hinzu, so beobachtet man, daß die Oxydation des Guajacols in der 2. Probe beträchtlich später einsetzt als in der 1., oder sogar völlig ausbleibt. Versetzt man die farblos gebliebene Probe mit etwas Essigsäure oder Citronensäure, so erfolgt normale Oxydation des Substrates. In ganz ähnlicher Weise verhält sich die Phenolase bei der Oxydation der Guajac-Emulsion. Dagegen ist der Salzgehalt des Wassers aus der Leitung auf die Oxydation des Pyrogallols und des Hydrochinons durch Phenolase ohne merklichen Einfluß. Daß die Beeinflussung der Phenolasewirkung durch Säuren und Salze von der Natur der Substrate abhängt, ist von Bach und Sbarsky¹⁾ und Bach und Maryanovitsch²⁾ durch zahlreiche Versuche festgestellt worden. Zu erwähnen ist noch, daß bei manchen Tyrosinasepräparaten, die auf Guajacol scheinbar ohne Einwirkung sind, die Oxydation durch Zusatz einer Spur Essigsäure ausgelöst werden kann.

Stellt man Tyrosinase aus Pilzen dar, deren Oxygenase ziemlich beständig ist, so enthält das Präparat in größeren oder geringeren Mengen die unveränderte „volle“ Phenolase (Peroxydase + Oxygenase). Wendet man dagegen zur Darstellung der Tyrosinase Pflanzenmaterialien an, deren Oxygenase leicht veränderlich ist, wie man es bei den meisten Phanerogamen beobachtet, so geht die Oxygenase zum größten Teil zugrunde und das Tyrosinasepräparat enthält dann überschüssige Peroxydase, wovon man sich durch die bekannten Peroxydase-reaktionen leicht überzeugen kann.

Bertrand und Muttermilch³⁾ sollen aus Weizenkleie eine phenolasefreie Tyrosinase dargestellt haben. Ich habe den Versuch wiederholt und folgendes festgestellt:

Frische Extrakte aus Weizenkleie weisen die Tyrosinase- und Phenolasereaktionen auf. Unterwirft man ein Extrakt der fraktionierten

¹⁾ Diese Zeitschr. **34**, 473, 1911.

²⁾ Diese Zeitschr. **42**, 417, 1912.

³⁾ Bull. Soc. Chim. **1**, 837, 1048, 1907.

Fällung mit Alkohol in Gegenwart von Magnesiumsulfat, so geben die oberen Fraktionen (2 bis 3 Vol. Alkohol) schwache oder gar keine Phenolasereaktionen, obgleich sie Tyrosin, wenn auch ziemlich langsam, oxydieren. Sämtliche Präparate enthalten aber reichlich Peroxydase. So groß ist der Peroxydasegehalt der Präparate, daß die Weizenkleie als ein leicht zugängliches Material für die Darstellung dieses Fermentes empfohlen werden kann. Bekanntlich läßt sich bei der Phenolasewirkung die teilweise oder gänzlich zerstörte Oxygenase durch Hydroperoxyd ersetzen. Sehr bemerkenswert ist daher die Tatsache, daß die Wirkung der Tyrosinase aus Weizenkleie auf Tyrosin durch Hydroperoxyd beträchtlich beschleunigt wird. In Abwesenheit von Oxygenase bzw. Hydroperoxyd ist die Peroxydase an der Oxydation der Abbauprodukte des Tyrosins derartig beteiligt, daß letztere leicht Sauerstoff aufnehmen und daher Peroxyde bilden, deren weiterer Umsatz durch das Ferment beschleunigt wird (siehe weiter unten).

Chodat und Schweizer¹⁾ geben an, daß die nach Chodat und Staub aus Kartoffelschalen dargestellte Tyrosinase keine Phenolase enthält. Ein genau nach ihren Vorschriften dargestelltes Präparat erwies sich als eine schwache Tyrosinase; es oxydierte aber auch Pyrogallol und enthielt überschüssige Peroxydase. Dementsprechend konnte auch hier die Oxydation des Tyrosins, wie ich²⁾ es schon vor mehreren Jahren bewiesen habe, durch Hydroperoxyd beschleunigt werden.

Auf Grund obiger Tatsachen glaube ich behaupten zu können, daß die Phenolase bzw. Peroxydase ein normaler Bestandteil der Tyrosinase ist und die Oxydation der Abbauprodukte des Tyrosins durch die Vermittlung des freien Sauerstoffs bewirkt.

III. Während der ersten Phase der Tyrosinasewirkung entstehen aus Tyrosin Produkte, die durch Phenolase bzw. Peroxydase + Hydroperoxyd leicht oxydiert werden.

Wie oben erwähnt, entfärbt sich das bei der Einwirkung der Tyrosinase auf Tyrosin bei Luftzutritt zunächst entstehende rote Produkt, wenn man die Luft durch eine Stickstoffatmosphäre ersetzt. Erhitzt man nun das farblose Reaktionsgemisch zum Kochen zwecks Zerstörung der Fermente und fügt nach Abkühlen Peroxydase (aus Meerrettich) und Hydroperoxyd hinzu, so nimmt es augenblicklich die für die späteren Phasen der Tyrosinasewirkung charakteristische braun- bis schwarzviolette

¹⁾ Arch. sc. phys. et nat. **34**, 140, 1913.

²⁾ Ber. **39**, 2126, 1906.

Färbung an. Der Versuch kann mit gleichem Erfolg in wenigen Minuten folgenderweise ausgeführt werden:

Eine heiß gesättigte und auf 40° abgekühlte Tyrosinlösung wird mit kräftiger Tyrosinase an der Luft geschüttelt, wobei sie sich schon nach 5 bis 10 Minuten intensiv rot färbt. Die rote Lösung wird dann durch Aufkochen entfärbt, abgekühlt und mit Peroxydase + Hydroperoxyd versetzt. Je nach den Konzentrationsverhältnissen schwanken die erhaltenen Färbungen von hellbraun bis schwarzviolett. Überschüssiges Hydroperoxyd entfärbt das Reaktionsprodukt, wie es auch Kaliumpermanganat in saurer Lösung tut.

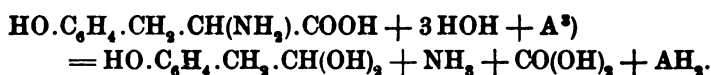
Wendet man tyrosinasefreie Phenolase anstatt Peroxydase + Hydroperoxyd an, so beobachtet man die gleichen Färbungserscheinungen, aber die Reaktion verläuft hier langsamer, wie es stets bei der Phenolase, die kein fertiges Peroxyd enthält, der Fall ist.

Durch das Vorbehandeln mit Tyrosinase unter den angegebenen Bedingungen wird nur ein geringer Bruchteil des anwesenden Tyrosins der Oxydation durch Phenolase bzw. Peroxydase + Hydroperoxyd zugänglich. In beiden Fällen kommt die Reaktion bald zum Stillstand und liefert nur kaum merkbare Melaninmengen. Versetzt man dann das Reaktionsgemisch mit frischer Tyrosinase, so erfolgt weitere Umwandlung und Oxydation des unangegriffenen Tyrosins unter Bildung eines beträchtlichen Melaninniederschlags. Die gleiche Erscheinung kann auch in der Weise veranschaulicht werden, daß man Tyrosin in obiger Weise mit Tyrosinase vorbehandelt und mit dem entfärbten Reaktionsgemisch vergleichende Oxydationsversuche durch die Vermittlung von frischer Tyrosinase, Phenolase und Peroxydase + Hydroperoxyd ausführt.

Das entfärbte Reaktionsgemisch ist an und für sich dem freien Sauerstoff gegenüber nicht völlig indifferent, denn nach längerem Stehenlassen an der Luft nimmt es ähnliche Färbungen wie unter dem Einflusse der Phenolase bzw. Peroxydase + Hydroperoxyd an und liefert schließlich geringe Melaninmengen. Es handelt sich also hier um eine von selbst langsam verlaufende Reaktion, die durch die Phenolase beschleunigt wird. Da Tyrosin beim Stehenlassen an der Luft weder für sich allein noch in Gegenwart von Phenolase eine merkliche Veränderung erfährt, so drängt sich der Schluß auf, daß es während der ersten Phase der Tyrosinasewirkung in einfachere, durch die Phenolase oxydierbare Produkte aufgelöst wird.

Betreffend die Natur dieser Produkte sei folgendes hervor-
gehoben:

Chodat und Schweizer¹⁾ machten vor kurzem die wichtige Beobachtung, daß Glykokoll durch die Tyrosinase aus Kartoffelschalen zu Formaldehyd, Kohlensäure und Ammoniak oxydiert wird. Gelegentlich jetzt im Gange befindlicher Versuche über die fermentative Beschleunigung der Aldehydbildung aus Aminosäuren habe ich die Versuche von Chodat und Schweizer wiederholt und bestätigt. Die Richtigkeit ihrer Beobachtung ist auch von Keeble, Frankland Armstrong und Jones²⁾ bestätigt worden. Dadurch ist bewiesen, daß der Tyrosinasewirkung der hydroklastische Abbau der Aminosäuren im Sinne der Streckerschen Reaktion zugrunde liegt. Dementsprechend dürfte bei der Einwirkung von Tyrosinase auf Tyrosin zunächst p-Oxyphenylacetaldehyd neben Kohlensäure und Ammoniak entstehen:



Falls diese Annahme zutrifft, sollten bei der Einwirkung von Phenolase bzw. Peroxydase + Hydroperoxyd auf p-Oxyphenylacetaldehyd die gleichen Oxydationsprodukte, wie bei der Einwirkung von Tyrosinase auf Tyrosin, entstehen. Wegen der schweren Zugänglichkeit des p-Oxyphenylacetaldehyds konnte ich bisher sein Verhalten gegen diese Oxydationsagenzien noch nicht ermitteln. Versuche mit dem nächstniederen Homologen, dem p-Oxyphenylformaldehyd (p-Oxybenzaldehyd), ergaben interessante Resultate.

Zunächst ließ ich Peroxydase + Hydroperoxyd auf p-Oxybenzaldehyd (Kahlbaum) in 1%iger Lösung einwirken, konnte aber dabei nicht die mindeste Oxydation feststellen. Da bei der Streckerschen Reaktion Ammoniak abgespalten wird, so versuchte ich weiter die Oxydation in Gegenwart geringer Ammoniakmengen auszuführen. Schon nach wenigen Minuten färbte sich das Reaktionsgemisch rosarot, dann weinrot und schließlich braunrot mit Stich ins violette. Es sind dies die Färbungen, die auch bei der Einwirkung der Tyrosinase auf Tyrosin zu beobachten sind. In Abwesenheit von Hydroperoxyd bleibt die Oxydation aus, in Abwesenheit von Peroxydase geht sie mit unmeßbar kleinen Geschwindigkeit vor sich.

¹⁾ Arch. sc. phys. et nat. 34, 140, 1913.

²⁾ Proc. Roy. Society 87, 193, 1913.

³⁾ A ist hier ein Wasserstoffacceptor.

Die Erfahrung scheint also hier den theoretischen Voraussetzungen völlig zu entsprechen. Zu erwähnen ist allerdings, daß bei Kontrollversuchen mit Phenolase in Gegenwart von Ammoniak nicht die gleiche Oxydation des p-Oxybenzaldehyds erzielt werden konnte. Die Ursache dieser Anomalie habe ich noch nicht näher ermittelt. Allem Anschein nach wirkt der Ammonikzusatz auf die in der Phenolase enthaltene Oxygenase lähmend, denn auf Zusatz von Hydroperoxyd beobachtet man die gleichen Färbungserscheinungen, wie bei der Anwendung von Peroxydase. Daß die Phenolase dem Ammonik gegenüber bei weitem empfindlicher ist als die Peroxydase, ist von Sbarsky¹⁾ bewiesen worden.

Sei es wie es mag, Tatsache ist, daß bei der Einwirkung der Tyrosinase auf Tyrosin Produkte entstehen, die durch Phenolase bzw. Peroxydase + Hydroxyd leicht oxydiert werden, während dieselben Oxydationsagenzien auf das ursprüngliche Tyrosin ohne jede Wirkung sind.

IV. Die Vorbereitung des Tyrosins für die Oxydation durch Phenolase wird durch ein Ferment bewirkt.

Über das Agens, durch dessen Vermittelung das Tyrosin in durch Phenolase leicht angreifbare Produkte aufgelöst wird, kann ich noch nichts Näheres mitteilen. Es ist thermolabil, denn auf 70° erhitzte Tyrosinase-Lösung übt weder für sich allein noch auf Zusatz von Phenolase oder Peroxydase + Hydroperoxyd auf Tyrosin die mindeste Einwirkung aus. Man hat es also den üblichen Vorstellungen gemäß als ein Ferment zu betrachten.

Wie ich²⁾ schon vor mehreren Jahren durch quantitative Versuche bewiesen habe, ist für das Zustandekommen der Wirkung des Fermentes die Anwesenheit von freiem Sauerstoff ausschlaggebend. Es hat sich nämlich gezeigt, daß durch Vorbehandeln des Tyrosins mit Tyrosinase in einer Wasserstoffatmosphäre bei 25° während 24 Stunden die Geschwindigkeit der nachträglichen Oxydation des Tyrosins bei Luftzutritt nicht beeinflußt wird. Unter Sauerstoffausschluß findet also kein nennenswerter Abbau des Tyrosins statt. Wird die farblos

¹⁾ De l'influence des acides et des alcalis sur la phenolase et la peroxydase. Genève 1911. (Dissert.)

²⁾ Ber. 42, 594, 1909.

gebliebene Reaktionsflüssigkeit zwecks Zerstörung der Tyrosinase aufgekocht und nach Abkühlen mit Phenolase bzw. Peroxydase + Hydroperoxyd versetzt, so bleibt die Oxydation völlig aus.

Über die Bedeutung des Sauerstoffs für das Zustandekommen der Wirkung des Fermentes geben die von mir¹⁾ vor kurzem veröffentlichten Versuche über die Aldehydbildung aus Aminosäuren einige Aufschlüsse. Bei der Streckerschen Reaktion wird der Wasserstoffacceptor (Alloxan, Benzochinon) durch den bei der Spaltung des Wassers frei werdenden Wasserstoff allmählich reduziert. Die Einleitung der Reaktion ist von der An- oder Abwesenheit des Sauerstoffs unabhängig. Erst nachdem der Wasserstoffacceptor vollständig reduziert worden ist, wird die Mitwirkung des Sauerstoffs, der den reduzierten Acceptor zu der ursprünglichen Substanz oxydiert (Hydrochinon zu Chinon) für den weiteren Verlauf der Reaktion ausschlaggebend. Daß Sauerstoff schon zur Einleitung der Tyrosinasewirkung erforderlich ist, erklärt sich dadurch, daß das Ferment keinen fertigen Wasserstoffacceptor enthält; in einer Wasserstoffatmosphäre findet nicht die mindeste Spaltung des Tyrosins durch Tyrosinase statt, während unter gleichen Bedingungen die Spaltung des Alanins durch Benzochinon leicht nachweisbar ist. Mit den Tatsachen am besten vereinbar ist die Annahme, daß aus dem Ferment unter dem Einfluß des Sauerstoffs ein Wasserstoffacceptor entsteht, der abwechselnd durch den Wasserstoff des Wassers reduziert und durch den freien Sauerstoff (wahrscheinlich durch die Vermittelung der Phenolase!) oxydiert wird und die hydroklastische Oxydation des Tyrosins bewirkt.

Mit Rücksicht auf die Tatsache, daß das in der Tyrosinase enthaltene hydroklastische Ferment außer Tyrosinase noch Glykokoll und andere Aminosäuren angreift, schlage ich vor, es vorläufig mit dem Namen Aminoacidase zu belegen.

Schlußfolgerungen.

Aus den im obigen mitgeteilten Tatsachen, nämlich:

1. daß bei der Einwirkung von Tyrosinase auf Tyrosin ein kräftiger Reduktionsprozeß stattfindet;

¹⁾ Diese Zeitschr. 58, 205, 1913.

2. daß Tyrosinase stets Phenolase bzw. Peroxydase enthält;
3. daß bei der Einwirkung von Tyrosinase auf Tyrosin Produkte entstehen, die durch Phenolase leicht oxydiert werden;
4. daß schließlich an der Vorbereitung des Tyrosins für die Oxydation durch die Phenolase ein Ferment beteiligt ist, geht hervor, daß das bisher als Tyrosinase bezeichnete Ferment nicht eine einheitliche, spezifische Oxydase ist, sondern aus einem als Aminoacidase zu bezeichnenden Ferment, durch dessen Vermittelung Tyrosin auf hydroklastischem Wege zu leichter oxydierbaren Produkten abgebaut wird, und aus gewöhnlicher Phenolase, die diese Abbauprodukte weiter oxydiert, besteht.

Das Auftreten des Reduktionsprozesses bei der Tyrosinasewirkung bestätigt die Palladinsche¹⁾ Theorie der Atmungspigmente, wonach in Lebewesen enthaltene Chromogene abwechselnd zu Pigmenten durch den Luftsauerstoff unter Mitwirkung der Oxydasen oxydiert und durch Wasserstoff zu den ursprünglichen Stoffen reduziert werden. Die Bedeutung dieser Auffassung für das Verständnis der in der lebenden Substanz sich abspielenden hydroklastischen Oxydo-Reduktionsprozesse ist von mir²⁾ a. a. O. besprochen worden.

Der Befund, daß Tyrosinase ein Gemenge von Aminoacidase und Phenolase ist, bestätigt weiter in auffallender Weise die vor einigen Jahren von Mathews³⁾ ausgesprochene Ansicht, wonach die bisher als Oxydasen bezeichneten Fermente zwei Fermentklassen umfassen: die einen bewirken die Aktivierung des Sauerstoffs, die anderen, bei weitem wichtigeren, bringen die Spaltung der Substrate in eine Anzahl reduzierender Moleküle hervor. Die Fermente zweiter Art betrachtet Mathews vielmehr als Reduktionsfermente und schreibt ihnen eine Spezifität zu, während den eigentlichen Oxydasen keine Spezifität zukomme.

Es wäre von hohem Interesse, auch die weniger bekannten, anscheinend spezifischen Oxydasen (Alkoholoxydase, Uricooxydase, Xanthinoxydase) vom Standpunkt der Mathewsschen Auffassung näher zu untersuchen.

¹⁾ Diese Zeitschr. 18, 151, 1900.

²⁾ Oppenheimers Biochemie, Ergänzungsband S. 180.

³⁾ Journ. of Biolog. Chem. 6, 1, 1872.

Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen.

III. Artdifferenzen in der Durchlässigkeit der roten Blutkörperchen.

Von
Shuzo Kozawa.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 3. Februar 1914.)

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben gelehrt, daß die Durchlässigkeit der roten Blutkörperchen für den Traubenzucker von Tierart zu Tierart eine sehr verschiedene ist. Schon aus den älteren osmotischen Experimenten von Grijns¹⁾ und Hedin²⁾ an den Blutkörperchen von Huhn, Pferd und Rind geht hervor, daß diese Blutkörperchen sich gegen den Traubenzucker wie impermeabel oder allenfalls wie sehr schwer permeabel verhalten. Dieser Befund wurde für die Rinderblutkörperchen neuerdings von Masing³⁾ durch osmotische Versuche mit dem Hämatokriten bestätigt. Dasselbe Verfahren lehrte, daß auch die Blutkörperchen von Schwein, Hammel und Gans undurchlässig für Traubenzucker sind, während die reversible Schwellung menschlicher Blutkörperchen in isotonischer Traubenzuckerlösung auf die Durchlässigkeit dieser Blutkörperchensorte schließen ließ. Diese Unterschiede in der Permeabilität waren schon vorher auf dem sicheren direkten Weg der chemischen Analyse namentlich durch Rona und Michaelis⁴⁾ und durch Hollinger⁵⁾ festgestellt worden. Es

¹⁾ Grijns, Arch. f. d. ges. Physiol. 63, 86, 1896.

²⁾ Hedin, ebenda 68, 229, 1897.

³⁾ Masing, ebenda 149, 227, 1912.

⁴⁾ Rona und Michaelis, diese Zeitschr. 16, 60; 18, 514, 375, 1909; ferner 30, 99, 1910.

⁵⁾ Hollinger, ebenda 17, 1, 1909.

hatte sich gezeigt, daß bei Mensch und Hund der Blutzucker gewöhnlich sowohl im Plasma wie in den Blutkörperchen enthalten ist, während er beim Kaninchen oft in den Blutkörperchen fehlt, und daß Traubenzucker, den man zum Blut hinzufügt, sich bei Mensch und Hund alsbald auf Plasma und Körperchen verteilt, während er beim Hammel ganz und gar im Plasma verbleibt. Auch Masing stellte auf chemischem Wege die Impermeabilität der Blutkörperchen von Hammel, Schwein und Gans fest, während nach seinen Analysen in die Blutkörperchen vom Rind doch ein wenig Zucker überreten kann.

Es erhebt sich nun die Frage, von welchen sonstigen Eigenschaften der Blutkörperchen diese Permeabilitätsunterschiede abhängig sind. In der vorangehenden Untersuchung wurde gezeigt, daß in der Größe der elektrischen Ladung und in der Hämolysefähigkeit der Blutkörperchen artspezifische Unterschiede existieren. In einer anderen voranstehenden Arbeit machen Höber und Nast¹⁾ auf den Zusammenhang zwischen den Binnenelektrolyten der verschiedenen Blutkörperchenarten und ihrer Resistenz aufmerksam. Es könnte also erwogen werden, ob die Permeabilität von einem dieser Faktoren direkt oder indirekt abhängt. Namentlich liegt es nahe, zu prüfen, ob nicht die Binnenelektrolyte für die Permeabilität bestimmend sind. Denn manches spricht dafür, daß durch Salze die Permeabilität von Zellen geändert werden kann. Es sei hier von den zahlreichen Anhaltspunkten für solch einen Einfluß nur auf die mannigfachen Schutzwirkungen des Ca^{++} gegen Gifte verwiesen, ferner darauf, daß, entsprechend der Membrantheorie von Bernstein, die Salzruhestrome, etwa die Kaliströme nach Höber als Folgen lokaler Durchlässigkeitssteigerungen durch das Kalisalz aufgefaßt werden können²⁾. Vergleicht man freilich die Angaben von Masing über die verschiedene Permeabilität für Traubenzucker mit den Angaben von Höber und Nast über die Differenzen in der Resistenz bzw. Hämolysefähigkeit je nach der Art der Binnenelektrolyte, so scheint ein Zusammenhang zwischen Binnenelektrolyten und Permeabilität nicht vor-

¹⁾ Höber und Nast, diese Zeitschr. 60, 131, 1914.

²⁾ Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, Kap. 12. 3. Aufl. 1911.

handen zu sein. Denn nach Masing stehen bezüglich der Permeabilität für den Zucker die Blutkörperchen von Mensch und Hund den Blutkörperchen von Schwein, Hammel und auch Rind gegenüber, während nach der Verteilung der Binnenelektrolyte und der Resistenz die Blutkörperchen von Mensch, Rind und Hammel zusammengehören, die vom Hund eine Mittelstellung einnehmen, und die Blutkörperchen vom Schwein das ganz andere Verhalten aufweisen. Dennoch erschien der mögliche Zusammenhang noch einmal der Prüfung zu bedürfen; denn für Schwein, Kaninchen und Hammel gibt Masing nur je einen Versuch an, setzt hinter das Ergebnis, daß die Blutkörperchen vom Hammel für Traubenzucker impermeabel seien, selbst sozusagen ein Fragezeichen, weil der Hammel anämisch gewesen sei, und verzeichnet für seine zwei Versuche an Rinderblut bei dem einen eine Störung durch Glykolyse. Die Nachprüfung hat jedoch Masings Ergebnisse bestätigt. Von Prof. Höber wurden mir die in folgender Tabelle zusammengestellten Analysenergebnisse zur Verfügung gestellt. Alle Analysen beziehen sich 1. auf Fluornatrium-Blut und 2. auf Fluornatrium-Blut desselben Tieres, dem Traubenzucker zugesetzt war. Das Blutkörperchenvolumen wurde nur näherungsweise mit dem Hämatokriten bestimmt, indem bis zur Konstanz des Volumens zentrifugiert wurde. Blut und Plasma wurden nach der Eisenmethode von Michaelis und Rona gefällt, der Zucker nach Bertrand titriert. Der Zuckergehalt der Blutkörperchen wurde aus den Werten für Gesamtblut und Plasma berechnet.

Tierart	Fluornatrium-Blut			Gezuckertes Fluornatrium-Blut						
	Blutkörperch. Vol.	% Traubenzucker			Blutkörperch. Vol.	% Traubenzucker			Traubenzucker (Plasma): Traubenzucker (Blut.) = q	q korr.
		Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen		Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen		
Mensch . . .	33,0	0,0683	0,0692	0,0664	35,0	0,5014	0,5664	0,3909	1,5	1,57
Hund . . .	32,9	0,1002	0,1165	0,0669	33,8	0,5711	0,7332	0,2518	2,9	3,66
Hammel . . .	32,3	0,0329	0,0471	0,0031	31,9	0,4687	0,6369	0,1066	6,0	12,50
Ziege . . .	—	—	—	—	30,3	0,5007	0,6853	0,0609	9,8	74,80
Pferd . . .	39,0	0,0811	0,0847	0,0754	41,0	0,4999	0,8252	0,0315	26,2	∞
" . . .	37,0	0,0540	0,0779	0,0132	39,2	0,4934	0,7961	0,0237	33,6	∞
Rind . . .	27,5	0,0491	0,0561	0,0447	28,5	0,3395	0,4750	0	∞	∞
" . . .	23,0	0,0789	0,0892	0,0444	23,2	0,4880	0,6461	0	∞	∞

Die Tabelle lehrt, daß die Blutkörperchen von Mensch und Hund die übrigen an Permeabilität für den Traubenzucker überragen. Dabei sind die errechneten Werte für die Blutkörperchen jedenfalls öfter zu groß, da auch nach Zentrifugieren bis zur Volumenkonstanz doch noch Plasma zwischen den Blutkörperchen hängen bleibt. Deshalb ist neben dem in der vorletzten Kolonne verzeichneten Verhältnis: Plasma-Zucker:Blutkörperchen-Zucker in der letzten Kolonne dasselbe Verhältnis nochmals angegeben, unter der Voraussetzung berechnet, daß von dem hämatokritisch gemessenen Blutkörperchenvolumen nur 90% wahres Blutkörperchenvolumen sind. Man sieht deutlich, daß den Blutkörperchen von Mensch und Hund diejenigen von Hammel, Ziege, Pferd und Rind gegenüberstehen.

Nach diesem Ergebnis habe ich auf Veranlassung und unter Leitung von Prof. Höber die Frage geprüft, ob die erhöhte Durchlässigkeit der Blutkörperchen von Mensch und Hund sich allein auf den Traubenzucker bezieht oder auch auf andere Verbindungen¹⁾. Zur Lösung der Frage wurde zunächst die einfachste Methode als Orientierungsmittel gewählt, nämlich so, wie es Hedin, Masing u. a. getan haben, mit dem Hämatokriten festgestellt, wie sich das Volumen gleicher Blutkörperchenmengen in verschiedenen untereinander isotonischen Lösungen ändert. Natürlich kamen hier nur solche Verbindungen in Frage, die nach den zahlreichen osmotischen Versuchen an dem verschiedensten Zellmaterial im allgemeinen als nicht permeierend und darum auch nicht hämolysierend gelten konnten, also im wesentlichen die sog. lipoidunlöslichen, zu denen ja der Traubenzucker selbst gehört, der sich ja auch in der Tat den meisten Zellen gegenüber, wie wir sahen, auch den meisten Blutkörperchen gegenüber wie nicht permeierend verhält. Die im folgenden genannten Verbindungen waren Präparate von Merck und von Kahlbaum, die nicht weiter gereinigt wurden; für die Überlassung von Glucoheptose sind wir Herrn Geheimrat Emil Fischer, für das Methylgalaktosid Herrn Geheimrat Thierfelder und für die Sorbose Herrn Geheimrat Emil Fischer und Herrn Prof. Embden zu großem

¹⁾ Vorläufige Mitteilung der Resultate siehe Kozawa, Centralbl. f. Physiol. 27, 15, 1913.

Dank verpflichtet. Das hexosephosphorsaure Natrium stellten wir uns aus dem betreffenden Calciumsalz her, das uns Herr Prof. Euler freundlichst zur Verfügung stellte.

I. Hämatokritversuche.

Zu diesen Versuchen wurden aus defibriertem Blut abzentrifugierte, nicht weiter gewaschene Blutkörperchen verwendet. Es wurde stets 1 ccm derselben mit 2 ccm isotonischer Lösung vermischt. Die Lösungen waren ungefähr auf gleichen Gefrierpunkt eingestellt, wie aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist.

Traubenzucker	0,565 ⁰	Hexosephosphor-	
Galaktose	0,568 ⁰	saures Na	0,558 ⁰
Mannose	0,558 ⁰	Rhamnose	0,562 ⁰
Lävulose	0,566 ⁰	Mannit	0,588 ⁰
Sorbose	0,556 ⁰	Dulcit	—
Milchzucker	0,562 ⁰	Adonit	0,563 ⁰
Rohrzucker	0,570 ⁰	Erythrit	0,562 ⁰
Maltose	0,568 ⁰	Glycerin	0,560 ⁰
Arabinose	0,558 ⁰	Glykokoll	0,557 ⁰
Xylose	0,557 ⁰	Alanin	0,562 ⁰
Glucoheptose	0,560 ⁰	Asparagin	—
Methylglucosid	0,554 ⁰	Weinsaures Na	0,555 ⁰
Methylgalaktosid	0,549 ⁰	Essigsaures Na	0,554 ⁰
		Brenztraubensaures Na	0,558 ⁰

Der Gefrierpunkt der Asparagin- und der Dulcitolösung konnte nicht gemessen werden, da die gelösten Stoffe in der Kälte ausfielen. Zur jeweiligen Blutkörperchen-Volumenbestimmung wurden die Gemische stets 15 Minuten lang zentrifugiert, gewöhnlich je 4 gleichzeitig. Aus den sehr zahlreichen Versuchen teile ich einige besonders wichtige oder sonst orientierende Protokolle mit; die Zahlen bedeuten die Volumenprozentage nach den verschiedenen Einwirkungszeiten der gelösten Stoffe:

1. Mensch.

	Traubenzucker	Lävulose	Mannit	Kochsalz
Nach 15 Min.	37,7	29,5	27,0	32,5
" 1 Std.	43,3	31,0	26,0	31,2
" 4 "	53,0	38,5	27,0	31,5
" 7 "	57,0	46,0	26,0	31,0

	Traubenzucker	Galaktose	Mannose	Kochsalz
Nach 20 Min.	33,0	43,0	37,0	31,0
" 1 Std.	38,5	54,0	47,5	29,5
" 2 "	42,3	54,0	51,5	29,5
" 17 "	52,0	hämolyziert	hämolyziert	29,5
	Galaktose	Arabinose	Xylose	Kochsalz
Nach 30 Min.	37,0	45,5	42,0	28,0
" 2 Std. 30 Min.	45,5	hämolyziert	hämolyziert	27,7
" 6 "	hämolyziert	"	"	27,5
	Traubenzucker	Alanin	Glykokoll	Kochsalz
Nach 20 Min.	33,5	27,2	27,2	28,5
" 4 Std.	46,5	29,0	27,5	29,0
" 6 "	50,5	28,5	27,5	29,0
" 21 "	hämolyziert	29,0	27,5	29,0
	Traubenzucker	Lävulose	Galaktose	
Nach 20 Min.	28,0	26,0	42,5	
" 2 Std.	38,2	21,2	47,0	
" 6 Std. 30 Min.	43,0	38,0	hämolyziert	
	Traubenzucker	Rohrzucker	Maltose	Kochsalz
Nach 20 Min.	30,2	26,5	27,0	25,0
" 2 Std.	39,0	25,3	26,5	25,0
" 6 "	41,0	26,0	26,5	25,0
" 7 "	45,3	25,5	25,5	25,0
	Traubenzucker	Milchzucker	Methylglucosid	Asparagin
Nach 20 Min.	33,0	27,0	30,0	29,5
" 1 Std. 30 Min.	39,0	26,0	30,0	34,0
" 5 "	40,0	26,0	31,0	34,0
" 6 "	48,0	25,5	31,5	33,0
	Traubenzucker	Dulcitol	Rhamnose	Adonit
Nach 15 Min.	34,3	27,3	28,8	24,9
" 2 Std.	43,6	23,1	29,2	29,0
" 6 "	46,0	23,1	31,5	30,3
" 23 "	53,0	25,0	30,4	32,1
	Glucoseheptose	Traubenzucker	Sorbose	Adonit
Nach 15 Min.	30,0	34,0	34,1	25,0
" 2 Std.	27,5	42,1	50,0	27,0
" 6 "	27,6	48,0	56,5	29,3
" 23 "	25,5	53,5	hämolyziert	34,2
	Traubenzucker	Brenztraubensaures Na	Rhamnose	Methylgalaktosid
Nach 15 Min.	31,0	31,0	27,8	30,0
" 2 Std.	39,0	31,0	26,7	30,0
" 7 "	44,0	31,0	28,7	30,0

	Brenztrauben- saurer Na	Methyl- galaktosid	Essigsaurer Na	Weinsaurer Na
Nach 15 Min.	30,2	27,8	29,0	25,5
" 6 Std.	30,1	27,8	27,9	27,0
" 23 "	29,9	28,5	28,5	28,0

Aus diesen Protokollen sind folgende Unterschiede in der Permeabilität der menschlichen Blutkörperchen für die einzelnen untersuchten Verbindungen zu entnehmen:

Permeabel für: {
Arabinose, Xylose.
Galaktose, Mannose, Sorbose.
Glucose.
Lävulose.

Etwas permeabel für: Adonit.

Impermeabel für: Rohrzucker, Maltose, Milchzucker, Glucoheptose, Methylglucosid, Methylgalaktosid, hexosephosphorsaures Natrium, Mannit, Dulcit, Rhamnose, Alanin, Glykokoll, Asparagin, brenztraubensaures Natrium, essigsaurer Natrium, weinsaurer Natrium, Kochsalz.

Die beobachteten Schwellungen der Blutkörperchen dürfen als osmotische Vorgänge infolge von Permeabilität für den außen befindlichen Stoff aufgefaßt werden, weil sie in isotonischer Kochsalzlösung wieder zurückgehen.

2. Hund.

Ganz anders verhielten sich in den Hämatokrit-Versuchen die Blutkörperchen vom Hund:

	Alanin	Glucoheptose	Dulcit	Lactose
Nach 15 Min.	29,0	31,0	29,1	29,0
" 5 Std.	27,5	32,0	26,8	28,0
" 7 "	teilweise hämolyisiert	32,2	teilweise hämolyisiert	teilweise hämolyisiert
	hämolyisiert	etwas hämolyisiert	hämolyisiert	hämolyisiert

	Traubenzucker	Fruotose	Rhamnose	Adonit
Nach 15 Min.	27,8	29,8	31,0	30,0
" 5 Std.	30,0	28,0	33,5	32,0
	überall nach 5 Std. schwache Hämolyse.			

	KCl	LiCl	Weinsaurer Na	Essigsaurer Na
Nach 15 Min.	31,0	26,8	30,0	29,2
" 6 Std.	35,0	28,1	27,3	29,0
	hämolyisiert	schwach hämolyisiert	schwach hämolyisiert	etwas hämolyisiert

Aus diesen wenigen Protokollen ist schon zu entnehmen, daß die Blutkörperchen vom Hund in allen geprüften isotonischen reinen Lösungen Hämoglobin abgeben, aber ohne vorher in erheblichem Maße anzuschwellen. Dies kann entweder so gedeutet werden, daß die Blutkörperchen für alle geprüften Verbindungen zwar permeabel sind, aber nicht schwellungsfähig, so daß ihre Oberfläche schon bei der ersten osmotischen Dehnung defekt wird, oder so, daß alle reinen isotonischen Lösungen an sich schädigend wirken.

Daß die Hundebloodkörperchen an Schwellungsfähigkeit nicht hinter andern Blutkörperchenarten zurückstehen, ist etwa aus folgenden Protokollen zu ersehen:

Hund.				
	0,9% NaCl	0,7% NaCl	0,6% NaCl	0,5% NaCl
Nach 15 Min.	33,0	34,0	36,5	40,0
" 1 Std. 30 Min.	31,7	34,0	36,8	39,0
" 5 " 30 "	32,8	35,8	38,2	42,2

Kaninchen.				
	0,9% NaCl	0,7% NaCl	0,6% NaCl	0,5% NaCl
Nach 15 Min.	29,0	34,7	35,5	41,0
" 5 Std.	30,0	33,9	35,6	41,4
		Spur Hämolyse	hämolyziert	hämolyziert

Mensch.				
	0,9% NaCl	0,7% NaCl	0,6% NaCl	0,5% NaCl
Nach 25 Min.	26,0	27,0	30,0	33,4

Also darf man schließen, daß die reinen isotonischen Lösungen aus irgendwelchen Gründen die Blutkörperchen von vornherein lädieren, so daß sie gar nicht dazu kommen, Permeabilitätsdifferenzen gegenüber den einzelnen Stoffen durch verschiedenartige Schwellung anzuzeigen. Darum versuchten wir, durch Zusätze zu den reinen isotonischen Lösungen die Schädlichkeit herabzusetzen. Dies gelang auch, die Hämoglobinabgabe wurde verzögert, aber Volumenänderungen als Anzeichen von Permeabilitätsdifferenzen traten danach nicht hervor:

Hund.				
	0,7 ccm NaCl	0,7 ccm NaCl	0,7 ccm NaCl	0,7 ccm NaCl
	1,3 " Galakt.	1,3 " Xylose	1,3 " Maltose	1,3 " Glykok.
Nach 40 Min.	27,5	25,2	25,5	28,0
" 7 Std.	24,8	25,0	25,5	29,0
" 24 " hämolyziert		23,8	hämolyziert	29,0

Hund.

	1,0 ccm Traubenz.	1,3 ccm Traubenz.	1,0 ccm Traubenz.	1,3 ccm Traubenz.
	1,0 ccm Ringer	0,7 ccm Ringer	1,0 ccm Serum	0,7 ccm Serum
Nach 50 Min.	30,0	29,2	28,2	29,0
" 7 Std. 30 Min.	29,7	27,8	26,5	28,4

Mensch.

	1,0 ccm Traubenz.	1,3 ccm Traubenz.	0,4 ccm NaCl	0,4 ccm NaCl
	1,0 ccm Ringer	0,7 ccm Ringer	2,0 ccm Traubenzucker	2,0 ccm Lactose
Nach 15 Min.	30,0	35,0	37,0	24,5
" 2 Std.	34,8	39,8	46,5	24,0
" 6 "	35,2	41,3		

Hund.

	2,0 ccm Galaktose	2,0 ccm Galaktose	2,0 ccm Galaktose	2,0 ccm Galaktose
		0,2 ccm CaCl ₂ 1%	0,4 ccm CaCl ₂ 1%	0,6 ccm CaCl ₂ 1%
Nach 15 Min.	28,0	23,0	23,0	21,0
" 4 Std.	25,0	22,5	23,0	21,0
	hämolyisiert	Spur Hämolyse		
" 5 Std. 30 Min.	hämolyt.	21,5	20,2	19,0
		Spur Hämolyse	Spur Hämolyse	Spur Hämolyse

Hund.

	2,0 ccm Arabinose	2,0 ccm Arabinose	2,0 ccm Arabinose	2,0 ccm Arabinose
		0,2 ccm CaCl ₂ 1%	0,4 ccm CaCl ₂ 1%	0,6 ccm CaCl ₂ 1%
Nach 20 Min.	36,0	26,0	22,2	22,2
" 2 Std.	26,0	23,5	22,0	22,0
	starke Hämolyse	ziemlich hämolyt.	Spur Hämolyse	Spur Hämolyse

Mensch.

	2,0 ccm Traubenzucker 0,4 " CaCl ₂ 1%	2,0 ccm Lactose 0,4 " CaCl ₂ 1%
Nach 15 Min.	36,7	24,8
" 6 Std. 30 Min.	39,0	24,0

Man kann also durch Zusatz von isotonischer Kochsalz-, Ringer- oder Calciumchloridlösung oder durch Verdünnung mit Serum die hämolysierende Wirkung der reinen isotonischen

Lösungen vermindern, ohne daß sich jedoch dann Permeabilitätsunterschiede in Schwellungsdifferenzen äußern, während dies unter den entsprechenden Verhältnissen bei den menschlichen Blutkörperchen der Fall ist. All diese Hämatokritversuche geben also zunächst keinerlei Anhaltspunkte dafür, daß die Durchlässigkeit der Hundeblytkörperchen irgendwie derjenigen beim Menschen ähnelt.

Eher sprechen folgende Versuche für ein analoges Verhalten:

	Hund.	
	Ringer	Ringer mit 2,5% Traubenzucker
Nach 15 Min.	31,5	28,0
" 3 Std. 30 Min.	32,2	26,5
" 5 " 30 "	30,0	30,5
" 21 "	33,0	29,0

	Mensch.	
	Ringer	Ringer mit 2,5% Traubenzucker
Nach 20 Min.	24,3	23,8
" 1 Std. 30 Min.	24,2	23,5

	Rind.	
	Ringer	Ringer mit 2,5% Traubenzucker
Nach 15 Min.	29,0	21,0
" 2 Std.	28,5	21,7

	Mensch.	
	Ringer	Ringer mit 2,5% Mannit
Nach 10 Min.	30,0	21,0
" 3 Std.	31,0	19,0
" 18 "	32,0	21,0

In Ringer-Lösung, die durch Zusatz von 2,5% Traubenzucker stark hypertonisch gemacht ist, schrumpfen also die Blutkörperchen vom Hund ebenso wenig wie diejenigen vom Menschen, während im entsprechenden Versuch die Blutkörperchen vom Rind ihr Volumen verringern, weil sie, wie wir gleich zeigen werden, für Traubenzucker impermeabel sind. Ebenso schrumpfen im analogen Versuch die menschlichen Blutkörperchen beim Zusatz von Mannit, für den ja die menschlichen Blutkörperchen undurchlässig sind.

Sicherere Kriterien für die Permeabilität der Blutkörperchen vom Hund gaben die chemischen Analysen, von denen nachher die Rede sein wird.

3. Affe.

Das Blut von *Macacus Rhesus* verhielt sich ganz so wie menschliches Blut. Die folgenden Protokolle mögen dafür einige Beispiele geben.

	Traubenzucker	Galaktose	Mannose	Mannit
Nach 10 Min.	32,1	31,2	33,6	26,2
" 2 Std.	36,2	40,0	40,1	25,0
" 6 "	39,0	44,0	42,0	25,0
	Spur Hämolyse	ziemlich starke Häm.	mäßige Häm.	
	Sorbose	Glucoheptose	Lävulose	Adonit
Nach 15 Min.	31,0	25,5	27,0	27,0
" 2 Std.	40,0	25,6	28,5	26,8
" 7 "	46,6	25,2	31,2	27,0
	etwas hämolys.			
	Xylose	Arabinose	Rhamnose	Glykokoll
Nach 15 Min.	33,8	33,5	28,0	26,0
" 5 Std.	39,0	fast total hämol.	28,2	27,0
	ziemlich starke Häm.			
	Methylgalaktosid	Dulcitol	Milchzucker	Rohrzucker
Nach 15 Min.	31,5	27,0	26,0	26,0
" 6 Std.	32,0	26,0	26,0	26,5

4. Rind, Schwein, Kaninchen, Meerschweinchen, Ziege, Pferd, Hammel, Katze.

Die Blutkörperchen aller dieser Tiere verhielten sich in den Hämatokritversuchen ganz gleich: sie nahmen in keiner der isotonischen Lösungen an Volumen zu, verhielten sich also wie vollkommen undurchlässig. Auch dies sei durch einige Beispiele illustriert:

Rind.				
	Arabinose	Xylose	Glykokoll	Alanin
Nach 10 Min.	25,5	29,0	24,0	25,5
" 5 Std.	24,5	27,8	23,0	24,0
" 6 "	24,5	26,5	23,0	23,5
	Mannose	Mannit		
Nach 1 Std.	24,5	24,5		
" 15 "	25,0	25,0		

Meerschweinchen.				
	NaCl	Traubenzucker	Arabinose	Milchzucker
Nach 15 Min.	27,8	27,8	25,0	27,0
" 4 Std. 20 Min.	28,8	27,2	25,0	27,0

Hammel.				
	Rohrzucker	Milchzucker	Traubenzucker	Sorbose
Nach 10 Min.	25,3	25,0	25,2	25,0
" 3 Std.	25,5	25,0	25,3	24,8

Pferd.				
	Glucose	Arabinose	Alanin	Milchzucker
Nach 10 Min.	30,0	28,0	28,2	27,9
" 2 Std.	29,9	27,9	29,0	28,5

Schwein.				
	Traubenzucker	Lävulose	Galaktose	NaCl
Nach 15 Min.	24,2	27,0	23,5	25,5
" 5 Std. 20 Min.	23,7	27,5	23,5	25,0

Das Ergebnis der gesamten Hämatokritversuche ist also, daß die Blutkörperchen von Mensch und Affe, vielleicht auch vom Hund, sich vor den übrigen, d. h. vor den Blutkörperchen von Rind, Schwein, Hammel, Ziege, Kaninchen, Meerschweinchen, Katze und Pferd, durch eine erhöhte Durchlässigkeit auszeichnen. Diese betrifft aber merkwürdigerweise allein die einfachen Zucker, die Hexosen und Pentosen. Gegenüber allen anderen geprüften Stoffen verhalten sich die Blutkörperchen von Mensch und Affe (und Hund) gerade so undurchlässig wie die übrigen.

Selbstverständlich haben wir daraufhin auch die Durchlässigkeit der menschlichen Blutkörperchen bei Diabetes untersucht. Wir haben aber keinerlei Unterschiede gegen die Norm feststellen können; d. h. auch hier dringen am raschesten Arabinose und Xylose, langsamer Galaktose, Mannose und Sorbose, dann Glucose und noch langsamer Lävulose ein. Ein ganz verzögerter Eintritt des Adonits ist auch wiederum zu bemerken. Alle übrigen Stoffe gehen nicht hinein:

Diabetischer Mensch.				
	Traubenzucker	Galaktose	Mannose	Mannit
Nach 15 Min.	40,0	44,0	43,2	32,0
" 2 Std.	50,0	63,0	68,0	30,0
" 6 "	53,0	55,0	55,0	29,5
	ein wenig hämol.	starke Häm.	starke Häm.	

	Sorbose	Glucoheptose	Lävulose	Adonit
Nach 15 Min.	43,1	30,8	35,0	31,8
" 4 Std.	61,6	31,0	39,0	34,0
" 6 " 30 Min.	total hämol.	27,0	47,0	37,0
" 24 "	—	—	—	42,0
	Xylose	Arabinose	Rhamnose	Glykokoll
Nach 20 Min.	42,6	41,8	32,0	31,0
" 1 Std.	64,0	60,3	31,0	31,0
" 5 "	total hämol.	total hämol.	32,0	30,0

II. Chemische Analysen.

Die Schlußfolgerungen, zu welchen die Versuche des vorigen Abschnitts führten, schienen durch das Hämatokritverfahren allein nicht genügend gesichert. Sie wurden deshalb durch chemische Analysen in der Art kontrolliert, daß für einen Teil der in den Hämatokritversuchen verwendeten chemischen Verbindungen quantitative Bestimmungen der Verteilung auf Blutkörperchen und Plasma vorgenommen wurden. Hierzu wurden die Zucker ausgewählt; denn es schien ausreichend, sich für einen Teil der hämatokritisch geprüften Stoffe zu vergewissern, daß die Änderung oder Nichtänderung des Blutkörperchenvolumens ein sicheres Kriterium für Permeabilität oder Impermeabilität bildet. Die Zuckerbestimmung geschah durch Titration (nach Bertrand), nach Enteiweißung mit Eisenhydroxyd (nach Michaelis und Rona). Für die hier verfolgten Zwecke genügte es zunächst, ohne Rücksicht darauf, ob neben dem absichtlich den Blutkörperchen gebotenen Kohlenhydrat auch noch natürlicher Zucker mit anwesend war, den Gesamtzucker zu bestimmen. Handelte es sich um zugesetzte Disaccharide, so wurde nach der Enteiweißung das Filtrat einige Zeit mit Säure gekocht, um die Doppelzucker zu spalten. Das benutzte Blut war fast in allen Fällen mit Fluornatrium versetzt. Die Zucker wurden in 10%iger Lösung zugefügt, danach ca. 15 Minuten unter öfterem Umschütteln gewartet und darauf die Analyse begonnen. Die folgenden Tabellen enthalten die Ergebnisse.

Die chemischen Analysen bestätigen demnach die Ergebnisse der Hämatokritversuche an menschlichem Blut; die Monosen dringen reichlich in die Körperchen ein, die Disaccharide bleiben mindestens größtenteils draußen. Da jedoch, gerade so

1. Mensch.

Zugesetzter Zucker	Zucker in			Plasma-zucker: Körperchen-zucker
	Blut %	Serum %	Blut-körperchen %	
Glucose	0,6218	0,6906	0,4994	1,4
"	0,6313	0,6593	0,5672	1,2
Mannose	0,6352	0,7050	0,5347	1,3
Galaktose	0,4669	0,6146	0,2309	2,6
Arabinose	0,5084	0,6915	0,2263	3,0
Lactose	0,5639	0,7778	0,0854	9,1
"	0,5045	0,6752	0,0654	10,3
Maltose	0,4142	0,6152	0,0344	18,0

wie in den früher angeführten Versuchen, der Blutkörperchen-zucker nicht direkt bestimmt, sondern nur berechnet wurde, und da das in die Rechnung eingehende Blutkörperchenvolumen nicht genau, sondern nur mit dem Hämokriten gemessen wurde, so ist der Gegensatz zwischen den in der letzten Kolonne angeführten Werten für die einfachen und die Doppelzucker vielleicht auch Ausdruck völliger oder fast völliger Impermeabilität für die letzteren. Es wurde davon Abstand genommen, hierüber eine Entscheidung zu treffen.

2. Kaninchen, Schwein, Katze.

Zugesetzter Zucker	Zucker in			Plasma-zucker: Körperchen-zucker
	Blut %	Serum %	Blut-körperchen %	
Kaninchen.				
Mannose	0,6045	0,8578	0	∞
Arabinose	0,6642	0,9137	0,0064	40,0
Schwein.				
Arabinose	0,6075	1,0640	0,1600	6,3
"	0,6151	0,8886	0,1049	8,4
"	0,66925	1,0897	0,0386	28,2
"	0,6540	1,1019	0,0042	264,0
Xylose	0,5515	1,0240	0,0145	70,0
Galaktose	0,5249	0,8974	0,0412	21,8
Mannose	0,6710	0,9160	0,0316	28,9
Lactose	0,5170	0,8979	0,0698	13,0
"	0,4853	0,7331	0,0179	41,4
Maltose	0,5510	1,0598	0	∞
Katze.				
Glucose	1,1271	1,3309	0,0957	18,0

Auch hier stimmen wiederum Analysen und Hämatokritangaben überein; nach den Werten der letzten Kolonne sind die Blutkörperchen von Kaninchen, Schwein und Katze für alle Zucker gerade so wenig durchlässig, wie die Blutkörperchen des Menschen für die Disaccharide. Nur für Arabinose sind die Blutkörperchen vom Schwein vielleicht manchmal etwas durchlässiger.

3. Hund, Affe.

Zugesetzter Zucker	Zucker in			Plasma-zucker: Körperchen-zucker
	Blut ‰	Serum ‰	Blut-körperchen ‰	
Hund.				
Arabinose	0,7446	0,8930	0,3315	2,7
Xylose	0,7568	1,0618	0,2389	4,4
Mannose	0,6291	0,8634	0,2103	4,1
Galaktose	0,5868	0,8093	0,1735	4,7
"	0,5509	0,7025	0,1306	5,3
Sorbose	0,5079	0,7399	0,9903	7,3
(2 Tage altes Blut)				
Lactose	0,5027	0,7637	0,0505	15,1
"	0,5195	0,6702	0,0397	16,9
"	0,5913	0,9282	0,0052	178,5
"	0,4917	0,6850	0	∞
Maltose	0,4381	0,7169	0,0511	14,0
"	0,4225	0,5741	0,0157	36,6
"	0,6642	1,0176	0	∞
Affe.				
Glucose	0,5679	0,6352	0,3920	1,8

Die Analysen des Hundeblasses lehren, daß sich dessen Blutkörperchen anscheinend so wie die vom Menschen verhalten; es tritt hier wie dort der gleiche Gegensatz zwischen der Permeabilität für einfache und für Doppelzucker hervor. Die Hämatokritmethode hatte gegenüber den Hundeblasskörperchen ja wegen deren Empfindlichkeit einigermaßen versagt. Um so wichtiger sind die Angaben der chemischen Analyse, wenn deren Zahl auch noch nicht ausreicht, um sagen zu können, daß die Permeabilität für die Zucker und ihre nächsten Verwandten bei Hund und Mensch völlig übereinstimmt. Die eine Analyse vom Affenblass bestätigt die auch hämatokritisch gefundene Permeabilität für Glucose.

Nach all dem lassen sich also die aus den Hämato-

kritversuchen gezogenen Schlußfolgerungen aufrecht erhalten.

III. Erklärungsversuche.

Das völlig unerwartete Ergebnis der beschriebenen Versuche, nach denen sich aus einer größeren Zahl von Blutkörperchenarten diejenigen von Mensch, Affe und Hund absondern und eine Permeabilitäts-erhöhung aufweisen, aber eine Erhöhung, die sich auf eine ganz bestimmte Gruppe von Stoffen bezieht, führt selbstverständlich zu der Frage, wovon dieser Unterschied herrührt, durch was für Eigenschaften die Blutkörperchen von Mensch, Affe und Hund etwa sonst ausgezeichnet sind oder welcher Art die Bedingungen für die selektive Permeabilitätssteigerung sind, und dies zu fragen ist um so berechtigter, als die bevorzugten Stoffe eine bestimmte und wichtige Gruppe von Nahrungsstoffen bilden. Wir wissen ja über die Natur der Nahrungsaufnahme der Zellen noch fast nichts¹⁾; wir wissen nur, daß die Zellen für zahlreiche Stoffe, die sie im Leben nicht verwenden und die im allgemeinen nach ihrer Eigenschaft der Lipoidlöslichkeit zusammengefaßt werden können, durchlässig sind, daß sie sich dagegen im osmotischen Experiment und unter manchen anderen Bedingungen für die sog. lipoidunlöslichen Stoffe als undurchlässig erweisen, und daß gerade zu diesen Stoffen die Hauptderivate der Nahrungsstoffe, die nach der Spaltung im Verdauungstrakt den Zellen geboten werden, die einfachen Zucker, die Aminosäuren, ferner die anorganischen und organischen Neutralsalze gehören. Das Verhalten des Gros der hier untersuchten Blutkörperchen, der Blutkörperchen von Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Rind, Pferd, Hammel, Ziege, Schwein entspricht also der Norm, wenn sie gegenüber all den genannten Stoffen impermeabel sind; in dieser Beziehung ähneln diese Blutkörperchen zahlreichen anderen Zellsorten. Regelwidrig ist das Verhalten der drei besonderen Arten, der Blutkörperchen von Mensch, Affe und Hund. Da nun aber unter gewissen Bedingungen, die nur noch nicht genügend bekannt sind — sicherlich gehört mit dazu die physiologische Funktion —, die Zucker, die Aminosäuren, die Salze unzweifelhaft von den Zellen aufgenommen

¹⁾ Siehe hierzu R. Höber, *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*, Kap. 7. 3. Aufl. 1911.

werden, so kann man hoffen, vielleicht einen ersten Einblick in den bisher ganz unbekanntem Mechanismus der Zellernährung zu erhalten, wenn man den Sonderfall, wo unter Bedingungen, unter denen es sonst nicht geschieht, ein Nahrungsstoff in eine Zellart eindringt, aufklärt. Es ist ja in dieser Hinsicht besonders beachtenswert, daß es gerade die einfachen und nicht weiter substituierten Zucker sind, die von den Blutkörperchen der genannten Tierarten elektiv aufgenommen werden, und nicht etwa die Doppelzucker oder die höherwertigen Alkohole.

Die Versuche, einen Mechanismus, welcher der Aufnahme der einfachen Zucker zugrunde liegen könnte, aufzufinden, bewegten sich nach den Vorschlägen von Professor Höber hauptsächlich in viererlei Richtungen:

1. Rührt die Permeabilität der Blutkörperchen von der glykolytisch gebildeten Milchsäure her? An eine Erklärung in dieser Richtung konnte man allenfalls so lange glauben, als allein die Permeabilität der Blutkörperchen von Mensch und Hund für den Traubenzucker bekannt war. Denn man weiß¹⁾, daß gerade diese Blutkörperchen sich vor denjenigen von Rind, Hammel und Schwein durch den reichlichen Gehalt an glykolytischem Ferment auszeichnen. Ja, man könnte zunächst sogar annehmen, daß die Schwellung der Blutkörperchen in Traubenzuckerlösung beim Hämatokritversuch eine Säureschwellung und gar keine osmotische Schwellung ist. Aber nach der ausgiebigeren Prüfung, wie sie hier beschrieben wurde, fällt diese Erklärungsmöglichkeit. Denn die Blutkörperchen schwellen ja z. B. auch in den isotonischen Lösungen der Pentosen, die gar keine Milchsäurebildner sind²⁾. Aber auch durch einige einfache Experimente läßt sich dieser Deutungsversuch widerlegen. So war es gleichgültig, ob im Hämatokritversuch der Traubenzuckerlösung etwas Natriumbicarbonat zugesetzt wurde, oder nicht. So bewirkte Zusatz von Milchsäure bis zu einer Konzentration von 0,01-n zur isotonischen Mannitlösung zwar bei den Blutkörperchen von Mensch, Kaninchen, Meerschweinchen eine deutliche Schwellung, sie erstreckte sich aber allein auf den Anfang der

¹⁾ A. Loeb, diese Zeitschr. 49, 413, 1913.

²⁾ S. Oppenheimer, diese Zeitschr. 45, 30, 1912. Auch Griesbach und S. Oppenheimer, ebenda 55, 323, 1913. Ferner Levene und Meyer, Journ. of Biolog. Chem. 14, 149, 1913.

Versuche, und es schloß sich nicht das stundenlange Weiter-schwellen an, das beim Aufenthalt der menschlichen Blut-körperchen in der Lösung der einfachen Zucker regelmäßig zu beobachten war. So änderte es ferner nichts, ob im Häma-tokritversuch die aus dem defibrinierten Blut ausgeschleuderten Blutkörperchen in der reinen isotonischen Zuckerlösung oder in Zuckerlösung mit einem Zusatz von 0,3% Fluornatrium suspen-diirt wurden, wo doch das Fluornatrium die Glykolyse hemmt. Endlich verringerte auch der Zusatz von Toluol zu menschi-lichem Blut die Permeabilität nicht nennenswert, trotz der lähmenden Wirkung, die Toluol nach Rona und Döblin¹⁾ auf das glykolytische Ferment ausübt; dies zeigt etwa folgendes Analysenergebnis:

Menschliches Blut mit 1% Toluol:			
Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	
0,5615%	0,6607%	0,3811%	$\frac{\text{Pharmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 1,7$
Menschliches Blut ohne Toluol:			
Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	
0,6218%	0,6906%	0,4994%	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 1,4$

2. Beruht die größere Permeabilität der Blut-körperchen von Mensch, Affe und Hund auf fermentativen Fähigkeiten derselben? Wiederum wegen der schon genannten Tatsache, daß die Blutkörperchen von Mensch und Hund durch den besonders reichlichen Besitz von glyko-lytischem Ferment ausgezeichnet sind, könnte man an einen Zusammenhang der Permeabilität mit fermentativen Prozessen denken, und zwar etwa in dem Sinn, daß in der Plasmahaut anwesende Fermente die den Blutkörperchen angebotene Sub-stanz so umwandeln, daß sie eindringen kann; sekundär könnte dann durch weitere Reaktion die Substanz im Innern wieder frei gemacht werden. Dafür, daß Fermente in der Oberfläche von Zellen vorkommen, können etwa die Versuche von O. War-burg²⁾ angeführt werden, nach denen durch lipoidunlösliche und nicht eindringende Stoffe der Sauerstoffverbrauch von See-

¹⁾ Rona und Döblin, diese Zeitschr. **32**, 489, 1911.

²⁾ O. Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **57**, **60** und **66**, 1908 bis 1910.

igeleiern gewaltig angefacht werden kann. Aus diesen Gründen wurde versucht, durch fermentlähmende Agenzien die Permeabilität zu ändern. Aber der Zusatz von einigen hundertstel Prozent Kaliumcyanid war in Hämatokritversuchen ohne Einfluß, ebenso bewirkten Phenylharnstoff in einer Konzentration von 0,25% und Äthylurethan in einer Konzentration von 2%, wie die folgende Tabelle lehrt, keine Änderung der Verteilung, obwohl der Phenylharnstoff in dieser Konzentration den Sauerstoffverbrauch von Gänseblutkörperchen und von Bakterien um 30 bis 70% verringert¹⁾ und Äthylurethan in der 2%igen Lösung Nerven fast total lähmt²⁾:

Menschliches Blut mit Äthylurethan 2%:

Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	
0,6029%	0,6354%	0,5382%	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 1,2$

Menschliches Blut ohne Äthylurethan 2%:

Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	
0,6313%	0,6593%	0,5672%	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 1,2$

Menschliches Blut mit Phenylharnstoff 0,25%:

Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	
0,4797%	0,6090%	0,3781%	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 1,6$

Menschliches Blut ohne Phenylharnstoff 0,25%:

Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	
0,4131%	0,60097%	0,2362%	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 2,6$

Aus diesen selben Überlegungen heraus wurde auch geprüft, ob Hexose vielleicht als hexosephosphorsaures Natrium in die Blutkörperchen einzudringen vermag. Bekanntlich spielt diese Verbindung nach der Entdeckung von Harden und Young ja eine große Rolle bei der Zuckervergärung in der Hefe³⁾. Paine⁴⁾ hat zwar bereits für die Hefe selber gezeigt, daß die für den Betrieb in ihrem Innern so wichtige Verbindung, von außen zugesetzt, nicht die Plasmahaut zu passieren vermag;

¹⁾ O. Warburg und Wiesel, Arch. f. d. ges. Physiol. 144, 465, 1912.

²⁾ Höber, Arch. f. d. ges. Physiol. 120, 492, 1907.

³⁾ Siehe dazu: A. Harden, Alcoholic Fermentation, London 1911. Auch H. Euler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 80, 1912.

⁴⁾ Paine, Proc. Roy. Soc. Série B 84, 289, 1912.

dennoch schien ein Versuch an den Blutkörperchen nötig. Jedoch weder bei den Blutkörperchen vom Menschen oder Affen, noch bei denen von Schwein oder Ziege konnte im Hämatokritversuch eine Schwellung in der betreffenden isotonischen Lösung festgestellt werden:

Schwein.		Mensch.	
Hexose-phosphors. Na	1% NaCl	Hexose-phosphors. Na	0,95% NaCl
Nach 10 Min.	34,0	Nach 10 Min.	28,0
" 2 Std.	33,8	" 6 Std.	28,2
			30,0
			30,0

3. Läßt sich die Permeabilität der Blutkörperchen durch anorganische Stoffe ändern? Versuche in dieser Richtung sind jüngst von György¹⁾ veröffentlicht worden; wir können deren negatives Ergebnis nur bestätigen. György versuchte Hammel- und Kaninchen-Blutkörperchen durch Änderung der H⁺-Konzentration, durch Ca-, Mg-, Al-, Mn-, Oxalat-, SO₄-Ionen u. a. für Traubenzucker zu eröffnen; aber ohne Erfolg. Wir gingen auch den umgekehrten Weg und versuchten, die an sich durchlässigen Blutkörperchen durch künstliche Mittel weniger durchlässig zu machen. Vor allem konnte man daran denken, die Plasmahaut mit Ca⁺⁺ in dem gewünschten Sinne zu beeinflussen. Denn bekanntlich schützt Ca⁺⁺ nicht nur ganze Zellverbände gegen Auflockerung, sondern auch einzelne Zellen werden gegen cytolysierende Agenzien durch Ca⁺⁺-Zusatz widerstandsfähiger gemacht; die Hämolyse durch Saponin, durch Ammon- oder Kalisalze wird durch Ca⁺⁺ verringert, die Ruhestrom entwickelnden Eigenschaften der Kalisalze, die von Höber im Sinne der Bernsteinschen Membrantheorie als Ausdruck einer Permeabilitätssteigerung durch das Kalisalz gedeutet wurden, werden durch Ca⁺⁺ mehr oder weniger paralysiert, u. a. Die ausgeführten Hämatokritversuche sprachen nun zunächst auch nicht gegen den mutmaßlichen permeabilitätsverringernenden Einfluß des Ca⁺⁺:

Mensch.			
2 ccm Traubenzucker		2 ccm Traubenzucker	
0,4 " NaCl (0,7%)		0,4 " CaCl ₂ (1%)	
Nach 15 Min.	37,0		35,9
" 6 Min.	30 Min.	46,5	39,0

¹⁾ György, diese Zeitschr. 57, 441, 1918.

Wie in diesem Versuch, so blieb auch in anderen die Schwellung der menschlichen Blutkörperchen in Traubenzuckerlösung bei Zusatz von reichlich CaCl_2 an Stelle der entsprechenden Menge von NaCl deutlich zurück. Da dies jedoch allein auf einer verringerten Quellungsfähigkeit der Blutkörperchen ohne Änderung der Permeabilität beruhen konnte, so wurde die chemische Analyse zur Kontrolle herangezogen:

Menschliches Blut mit 0,15% CaCl_2 :			
Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	
0,5600%	0,6686%	0,4005%	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 1,7$

Menschliches Blut mit 0,1% NaCl :			
Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	
0,5530%	0,6623%	0,3891%	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 1,7$

Der Versuch zeigt, daß trotz des Zusatzes von 0,15% CaCl_2 zum defibrinierten Blut eine Verteilungsänderung nicht erfolgte.

Es wurde sodann auch noch der Einfluß von Kohlensäure und von Wasserstoffperoxyd geprüft. Nach älteren Untersuchungen von Höber¹⁾ über die Kataphorese von Blutkörperchen in Salzlösungen mit und ohne Gegenwart von CO_2 ist es wahrscheinlich, daß CO_2 die Permeabilität der Blutkörperchen steigert. Aus diesem Grunde wurde bei Schweineblut der Einfluß einer 25 Minuten währenden Durchleitung eines kräftigen CO_2 -Stromes durch das gezuckerte Blut auf die Verteilung des Zuckers untersucht:

Ca. 50 ccm Schweineblut 10 Min. CO_2 , dann Zuckerzusatz,
dann 15 Min. CO_2 :

Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	
0,5575%	1,0640%	0,0459%	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 23,2$

Nach der Größe des Quotienten Plasmazucker : Körperchenzucker beurteilt, ist also eine Änderung in der Verteilung nicht eingetreten. Ebenso wenig gelang es, durch Zusatz von 0,5% H_2O_2 zu einer zuckerhaltigen 0,95%igen Kochsalzlösung, in der die Blutkörperchen suspendiert waren, dem Zucker den

¹⁾ Höber, Arch. f. d. ges. Physiol. 102, 196, 1904.

Eintritt zu erzwingen; der Versuch war nahegelegt durch die Angabe von Szücs¹⁾, daß bei Spirogyren die Permeabilität für Ferrosalz und für Farbbasen bei der Behandlung mit H_2O_2 steigt:

Schweineblut mit 0,5% H_2O_2 :			
Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = \infty$
0,5045%	0,8139%	0%	

4. Ist die Permeabilität durch Produkte der inneren Sekretion zu ändern? Im Hinblick auf die Pathogenese von Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel lag diese Frage hier natürlich besonders nahe; auch könnte auf Grund der Versuche von Höber mit Sperling²⁾, in denen bei experimentellen Glykämien im allgemeinen eine Verschiebung der Zuckerverteilung zugunsten des Plasmas beobachtet wurde, ein Einfluß erwartet werden. Bisher ist es aber nicht gelungen, etwas Positives zu konstatieren. Die ausgeführten Versuche beziehen sich auf Adrenalin und Pituitrin. In den Hämatokritversuchen wurden 0,4 ccm der 0,1%igen Lösung von Adrenalin (in 0,7% NaCl) oder 0,4 ccm der zur Hälfte mit 0,95% NaCl verdünnten Lösung von Pituitrin (Parke, Davis & Co.) zu 2 ccm der isotonischen Zuckerlösung zugefügt:

Mensch.			
	2 ccm Traubenzucker 0,4 ccm NaCl (0,7%) + Adrenalin	2 ccm Traubenzucker 0,4 ccm NaCl (0,7%)	
Nach 15 Min.	34,0	37,0	
" 6 Std. 30 Min.	47,6	46,5	
	2 ccm Lactose 0,4 ccm NaCl (0,7%) + Adrenalin	2 ccm Lactose 0,4 ccm NaCl (0,7%)	
Nach 35 Min.	26,0	24,5	
" 2 Std.	26,0	24,0	
Rind.			
	2 ccm Traubenzucker 0,4 ccm NaCl (0,7%) + Adrenalin	2 ccm Traubenzucker 0,4 ccm NaCl (0,7%)	
Nach 15 Min.	24,0	24,0	
" 4 Std. 30 Min.	23,0	21,5	

¹⁾ Szücs, Jahrb. f. wissenschaftl. Botan. 52, 269, 1913.

²⁾ Höber, diese Zeitschr. 45, 207, 1912.

Mensch.

	1 ccm Traubenzucker, 0,2 ccm 0,95% NaCl, 0,6 ccm Blutkörperchen	1 ccm Traubenzucker, 0,2 ccm 0,95% NaCl + Pituitrin, 0,6 ccm Blutkörperchen	1 ccm Traubenzucker, 0,4 ccm 0,95% NaCl, 0,7 ccm Blutkörperchen	1 ccm Traubenzucker, 0,4 ccm 0,95% NaCl + Pituitrin, 0,7 ccm Blutkörperchen
Nach 15 Min.	31,3	32,8	35,0	34,0
" 2 Std. 45 Min.	38,3	43,9	38,0	40,0
" 7 "	39,5	43,9	45,2	46,0

Diabetischer Mensch.

	1 ccm Traubenzucker 0,4 ccm 0,95% NaCl 0,7 ccm Blutkörperchen	1 ccm Traubenzucker 0,4 ccm 0,95% NaCl + Pituitrin 0,7 ccm Blutkörperchen
Nach 15 Min.	38,4	37,2
" 2 Std.	46,2	46,0
" 18 "	59,0	59,0

Ebenso negativ verliefen die chemischen Analysen, z. B.

Menschliches Blut mit 0,005 % Adrenalin:

Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 2,61$
0,6293 %	0,8021 %	0,3083 %	

Menschliches Blut ohne Adrenalin:

Gesamtblut	Plasma	Blutkörperchen	$\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Körp.-Zucker}} = 2,66$
0,5993 %	0,7646 %	0,2866 %	

Es konnte also kein Einfluß von Adrenalin oder Pituitrin auf die Permeabilität der Blutkörperchen nachgewiesen werden. Vielleicht ist es zweckmäßiger, die inneren Sekrete innerhalb der Gefäßbahn längere Zeit auf die Blutkörperchen wirken zu lassen und dann erst die Permeabilitätsprüfung vorzunehmen; Versuche in dieser Richtung werden demnächst ausgeführt.

Nachwort von R. Höber.

Die in den voranstehenden Versuchen festgestellte Tatsache, daß die Blutkörperchen von Mensch, Affe und Hund im Gegensatz zu den Blutkörperchen einer größeren Zahl anderer Tiere selektiv permeabel für die einfachen Zucker (Hexosen und Pentosen) sind, während sie gerade so wie die übrigen Blutkörperchen für die Disaccharide, die methylierten Zucker, die den Hexosen und Pentosen entsprechenden Alkohole undurchlässig sind, erinnert an manche Erscheinungen des Stoffwechsels von einzelnen Organen, die sich teils untereinander nach ihrer

Fähigkeit, Kohlenhydrate zu verwenden, unterscheiden, teils von Tierart zu Tierart differente Fähigkeiten besitzen. So wird nach den Untersuchungen von Neukirch und Rona¹⁾ die motorische Tätigkeit des Kaninchendünndarms selektiv durch Glucose und Mannose in Konzentrationen von 0,1% angefacht, während Galaktose, Sorbose, Lävulose, Arabinose, Xylose, ebenso die Disaccharide, Hexite und Methylglucoside, auch die Aminosäuren indifferent sind; ein starkes Anregungsvermögen besitzt dagegen noch das brenztraubensaure Natrium. Etwas anders verhält sich nach denselben Autoren²⁾ das Herz von Kaninchen. Hier wird die Tätigkeit auch durch Galaktose intensiv gesteigert. Wieder etwas anders reagiert anscheinend das Herz vom Hund; nach Maclean und Smedley³⁾ wird dieses auch von der Lävulose angeregt. Organe sowohl wie Tiere unterscheiden sich also voneinander nach ihrem Vermögen, Kohlenhydrate für die Funktion zu verwerten. Das kann der Ausdruck von Permeabilitätsunterschieden sein, braucht es aber nicht zu sein. Denn erstens verbraucht z. B. der Kaninchendarm nach Neukirch und Rona Galaktose, ohne daß der Verbrauch die Tätigkeit steigert, zweitens ist ein funktioneller Verbrauch noch nicht Beweis für das Vorhandensein der Permeabilität, wenigstens nicht von Permeabilität in dem bisher hier angenommenen Sinne. Froschmuskeln z. B. verbrauchen bei der Contraction Zucker, verwenden zum Aufbau jedenfalls Aminosäuren, müssen beim Wachstum bestimmte Salze in sich anreichern, und sind doch dem osmotischen Experiment zufolge für alle diese impermeabel, müssen also irgendwie aktiv eingreifen, um ihren Bedarf an diesen Stoffen zu decken, müssen also noch eine aktive „physiologische“ Permeabilität neben der passiven besitzen. Man sieht, daß die Verhältnisse, was die Permeabilität anlangt, bei den beschriebenen Blutkörperchenversuchen viel durchsichtiger liegen. Würde man z. B. bei den roten Blutkörperchen nur die Glykolyse als Kriterium des Eindringens von Zucker verwerten können, so würden die Blutkörperchen von Hund und Mensch als impermeabel für Arabinose zu gelten

¹⁾ Neukirch und Rona, *Arch. f. d. ges. Physiol.* **144**, 555, 1912; **146**, 371, 1912.

²⁾ Neukirch und Rona, *ebenda* **148**, 285, 1912.

³⁾ Maclean und Smedley, *Journ. of Physiol.* **45**, 462, 1913.

haben, weil diese von ihnen nicht abgebaut wird. Die Frage nach der Permeabilität, nach der passiven Permeabilität, ist also eine notwendige Vorfrage, die erledigt werden muß, bevor wir über die Bedingungen des Stoffwechsels und der Arbeitsleistung bei verschiedenen Organen und verschiedenen Tieren zur Klarheit kommen können.

Die hier gewonnenen Ergebnisse wirken aber noch in anderer Beziehung anregend. Die Permeabilitätsunterschiede bei den Blutkörperchen der verschiedenen Tierarten sind offenbar am ersten als Differenzen in den Eigenschaften der Plasmamembranen aufzufassen. Dann wäre es denkbar, daß pathologische Verhältnisse aus Abänderungen der normalen Durchlässigkeit der Plasmahaut resultieren. Es liegt besonders nahe, hier an die Krankheiten des Kohlenhydratstoffwechsels, insbesondere den Diabetes zu denken. Es könnte sehr wohl sein, daß bei abnormer Membrankonstitution, etwa in der Leber, die einfachen Zucker nicht an den normalen Ort ihres Abbaus gelangen könnten; rechnet man mit dieser Möglichkeit, so dürfte an die Stelle der heutigen Theorien des Diabetes, die auf der Annahme abnormer fermentativer Fähigkeiten aufgebaut sind, eine „Membrantheorie des Diabetes“ gesetzt werden, und eine derartige Annahme ist nicht bloß ein Wort, denn sie bedeutet eine Fragestellung; man wird im Bann solch einer Idee größeren Wert als bisher darauf legen, die Bedingungen für künstliche reversible Permeabilitätsänderungen bei den Zellen kennen zu lernen, und sich mit größerem Interesse einer der elementarsten Aufgaben der Physiologie und auch der Pathologie widmen, nämlich der Aufklärung der Frage, wie eine Zelle die Nahrungstoffe in sich aufnimmt.

Es ist übrigens recht gut möglich, daß die Unterschiede in der Permeabilität der verschiedenen Blutkörperchen, die hier beschrieben wurden, mehr gradueller Art sind, als es zunächst scheint. Man kann sich mit dem Hämatokritverfahren leicht davon überzeugen, daß die erhebliche Permeabilität der Blutkörperchen von Mensch, Affe und Hund für Traubenzucker immerhin noch zurücksteht hinter derjenigen von Erythrit oder gar von Glycerin, die beide nach Overton zu den relativ langsam eindringenden Stoffen gehören. Dann kann man also in der Serie der verschiedenwertigen Alkohole konstatieren, daß

die Permeierfähigkeit steigt in der Reihenfolge: Mannit < Adonit < Erythrit < Glycerin; denn für Adonit ergaben die früher beschriebenen Versuche am Menschenblut eine geringe Permeabilität, die freilich beim Affenblut schon nicht zu konstatieren war, und Erythrit gehört zu den allgemein langsam eindringenden Verbindungen. Schneller als die Alkohole permeieren die Aldehyde; dem entspricht abermals eine Reihe mit steigender C-Kette: Glucoheptose < Hexosen < Pentosen, wie sie bei den Blutkörperchen von Mensch und Affe konstatiert wurde. Wenn es demnach vielleicht nur auf graduelle Unterschiede ankommt, bestehend in relativer Steigerung der für die Permeabilität allgemein maßgebenden günstigen Bedingungen in der Plasmahaut der verschiedenen Zellarten, so verlieren die hier gefundenen Unterschiede deshalb doch nicht an Interesse für die Physiologie und Pathologie der Stoffaufnahme, da nach wie vor die Frage nach der Natur dieser Bedingungen einer voll befriedigenden Lösung harret.

Zusammenfassung.

Hämatokritversuche sowie chemische Analysen lehren, daß die Blutkörperchen von Mensch, Affe und Hund für Hexosen und Pentosen durchlässig, für Heptose, Methylglucoside, Methylpentose, Hexite und Pentite, Disaccharide, Aminosäuren und Salze organischer Säuren undurchlässig sind. Die Blutkörperchen von Rind, Schwein, Meerschweinchen, Kaninchen, Pferd, Ziege, Katze und Hammel sind dagegen für sämtliche geprüfte Stoffe undurchlässig. Die Permeabilität für Hexosen und Pentosen steigt in der Reihenfolge: Lävulose < Glucose < Sorbose, Galaktose, Mannose < Xylose, Arabinose.

Es gelingt nicht, die Permeabilität der Blutkörperchen durch Milchsäure, durch fermentlähmende Stoffe, durch Produkte innerer Sekretion oder durch Salze zu ändern.

Zum Schluß sei es mir gestattet, Herrn Prof. Dr. Bethe für die gastliche Aufnahme in seinem Institut, sowie Herrn Prof. Dr. R. Höber für die Anregung und stete Unterstützung bei der Arbeit meinen besten Dank auszusprechen.

Untersuchungen über ein für die Art nicht spezifisches Eiweißantigen zellulären Ursprunges.

Von

R. Doerr und R. Pick.

(Aus dem bakteriologischen Laboratorium des k. und k. Militärsanitätskomitees in Wien.)

(Eingegangen am 15. Januar 1914.)

Es ist mit Sicherheit festgestellt, daß Zellarten von sehr verschiedener Provenienz im Kaninchenorganismus die Bildung eines identischen, amboceptorartigen Antikörpers hervorrufen¹⁾; nach den gangbaren Anschauungen der Immunitätslehre bedeutet es nur eine andere Formulierung dieser Tatsache, wenn wir allen diesen Zellen ein gleichartiges Eiweißantigen als Konstituens zuschreiben. Der Ausdruck „gleichartig“ bezieht sich natürlich nur auf die Antigenfunktion; eine chemische Identität wird dadurch nicht involviert, da wir ja wissen, daß gleiche antigene Fähigkeiten bei chemisch zweifellos differenten Substraten angetroffen werden.

Soweit unsere bisherigen Kenntnisse reichen, findet sich dieses Antigen 1. in den Organen bestimmter Säugetiere und Vögel, und zwar des Meerschweinchens, des Pferdes, der Katze, des Hundes, der Maus und des Huhnes; 2. in den Organen von gewissen Kaltblütern (der Schildkröte); 3. in den Erythrocyten und Spermatozoen des Schafes; 4. in Bakterien, Para-

¹⁾ Vgl. Forssmann, diese Zeitschr. 1911. — Forssmann und Hintze, ebenda 1912. — Doerr und Pick, ebenda 1913; Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1913. — Amako, Zeitschr. f. Chemotherapie 1912. — Rothacker, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1913. — Friedberger, ebenda und Berl. klin. Wochenschr. 1913. — Orudschiew, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1913. — Bail, ebenda. — Weil, diese Zeitschr. 1914. — Schiff, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 20, 1913.

typhus- und Gärtner-Bacillen; 5. in Tumor- (Carcinom-) Zellen der Maus.

Zwischen den roten Blutkörperchen und den Organen desselben Tieres besteht, wie schon aus dieser Aufzählung hervorgeht, in der Regel ein inverses Verhalten: sind die Organe reich an dem in Rede stehenden Antigen, so fehlt es in den Erythrocyten (Pferd, Meerschweinchen, Hund, Katze, Maus) und umgekehrt (Hammel). Aber auch hinsichtlich der einzelnen Organparenchyme lassen sich Ungleichmäßigkeiten in der Verteilung konstatieren, indem — wenigstens bei Warmblütern — der Antigengehalt der Leber und des Gehirnes weit hinter dem der Lunge, der Niere und des Myokards zurückbleibt. Bei antigenhaltigen Organen oder Erythrocyten trifft man geringe Mengen der Substanz auch im Plasma bzw. im Serum des betreffenden Tieres (für das Pferd, Meerschweinchen und den Hammel nachgewiesen); sie sind wahrscheinlich als sekundäre Beimengungen der Blutflüssigkeit aufzufassen, die ebenso wie die Antigen Spuren im Harn aus dem Gewebstoffwechsel oder aus dem Zerfall untergegangener Zellen stammen.

Merkwürdiger noch und schwerer zu erklären als dieses Vorkommen in Zellen von so differenter tierischer und pflanzlicher Herkunft ist das Fehlen des bezeichneten Antigens im Körper anderer Tierspezies, des Menschen, des Schweines, Rindes, Kaninchens und der Ratte, der Gans und der Taube, des Aales und des Frosches. Besonders muß es auffallen, daß in dieser Hinsicht auch solche Tiere ein diametral entgegengesetztes Verhalten zeigen (Rind und Hammel, Ratte und Maus, Taube und Huhn), die einander im natürlichen System nahestehen und bei denen andere Eiweißantigene, die Präcipitinogene des Serums, die Lysinogene der Erythrocyten ausgesprochene Verwandtschaftsreaktionen geben. Allerdings sei ausdrücklich hervorgehoben, daß exakte Beweise für den absoluten Mangel des für die Art nicht spezifischen Antigens in den Zellen der aufgezählten Tiere nicht vorliegen. Die Methoden des Nachweises bestehen — wie gleich auseinandergesetzt werden soll — in vitro-Reaktionen und Immunisierungen, bei denen stets nur gewisse maximale Mengen der zu prüfenden Gewebe zur Anwendung kamen, die aus versuchstechnischen Gründen nicht überschritten werden durften. Es wäre daher immerhin

möglich, daß sich der prinzipielle Unterschied zwischen den negativen und positiven Befunden auf eine graduelle, freilich sehr erhebliche Differenz reduziert, und einzelne Angaben in der Literatur, die vorläufig nicht weiter erörtert werden sollen, sprechen zugunsten dieser Annahme. Aber selbst von diesem Gesichtspunkte aus verlieren die angeführten Verhältnisse nicht an Interesse und Bedeutung.

Der Antikörper des geschilderten Antigens ist, wie bereits erwähnt, ein Amboceptor cytotoxischer Natur. Sein Vorhandensein wird durch die Schädigungen nachgewiesen, die die antigenhaltige Zelle beim Kontakt mit antikörperhaltigem Immuneserum erfährt, Schädigungen, die sich an gewissen Zellarten im Reagensglase demonstrieren lassen, bei anderen nur im Tierversuch durch Funktionsstörungen des im normalen Verbands stehenden Organes manifest werden. Als Testobjekt für das Experiment *in vitro* eignen sich nur Hammelerythrocyten, die einzige Art von roten Blutkörperchen, in der das Antigen auftritt; sie werden durch Zusatz von inaktivem Immuneserum, und zwar von sehr geringen Dosen (0,00002 bis 0,0002 ccm genügen für 0,05 ccm konzentrierte Hammelerythrocytensuspension), derart verändert, daß sie bei nachfolgender Einwirkung von Komplement ihr Hämoglobin austreten lassen. Die Prüfung im Tierversuch erfolgt am zweckmäßigsten am Meerschweinchen oder am Huhn, weniger gut am Hunde durch intravenöse Injektion; infolge der Reaktion des in den Organzellen dieser Tiere befindlichen Antigens mit dem eingespritzten Antikörper treten nach einer Inkubation von wenigen Sekunden bis Minuten stürmische Erscheinungen auf, die dem bekannten Bilde eines anaphylaktischen Choks in allen wesentlichen Punkten vollkommen gleichen (Phänomen der „primären Toxizität“ der Hammelerythrocyten- und Organantiseren von Kaninchen). Immunisiert man also — um das Gesagte anders auszudrücken — ein Kaninchen mit irgendeinem Organ vom Pferd, Meerschweinchen, Hund, von der Katze oder Maus, vom Huhn oder von der Schildkröte, oder mit Erythrocyten (Spermatozoen) vom Schafe oder endlich mit Paratyphus- oder Gärtner-Bacillen¹⁾, so erhält man in

¹⁾ A. Rothacker führt in seiner Arbeit über Paratyphus- und Gärtner-Antiseren vom Kaninchen nur die hämolytische Wirkung der-

jedem Falle ein Immuneserum, das im inaktiven Zustande 1. auf Hammelblutkörperchen als lytischer Amboceptor, 2. auf Meerschweinchen, Hühner und Hunde wie ein akutes Gift wirkt. Erythrocyten anderer Spezies oder antigenfreie Tierarten (Ratten, Tauben, Kaninchen) werden von derartigen Immunsera nicht stärker als von normalem Kaninchenserum beeinflußt.

Der hammelhämolytische und cytotoxische Amboceptor läßt sich aus jedem Kaninchen-Immuneserum dieser Kategorie durch den Kontakt mit irgendeiner antigenhaltigen Zellart und Abzentrifugieren derselben entfernen; ein Pferdenierenantiserum z. B. büßt seine lösende Kraft für Hammelblut und seine akute Toxizität für Meerschweinchen ein, gleichgültig, ob man Pferdeniere, Hammelerythrocyten, Schildkrötenleber, Hühnerlunge oder Paratyphusbacillen dazu verwendet. Dieser „Bindungsversuch“ stellt gleichzeitig einen indirekten und bequemen Weg dar, um zu konstatieren, ob eine noch nicht untersuchte Gewebsart Antigen enthält oder nicht, oder um mehrere Substrate mit Rücksicht auf ihren Gehalt an Antigen zu vergleichen.

Das wäre kurz skizziert der gegenwärtige Stand unseres Wissens. Ein weiteres Eindringen in die Materie, deren bedeutungsvolle Beziehungen zu bereits bekannten Forschungsergebnissen am Schlusse kurz besprochen werden sollen, dürfte vielleicht zunächst in der Weise zu erreichen sein,

selben auf Hammelerythrocyten an, hat aber (einer brieflichen Mitteilung zufolge) auch einen gewissen Grad von primärer Toxizität beobachtet. Er erhielt nach dreimaliger Vorbehandlung der Kaninchen mit den genannten Bakterien Sera, die in Dosen von 3 bis 4 ccm intravenös injiziert bei Meerschweinchen klonische Krämpfe, Dyspnoe, Harn- und Stuhl- abgang, Seitenlage, Temperaturabfall und Exitus in 3 bis 4 Stunden hervorriefen. Das Blut der verendeten Tiere war schlecht gerinnbar. Durch die Adsorption mit Hammelerythrocyten konnten die toxischen Sera komplett entgiftet werden. Normalkaninchenserum löste, bei Kontrollen in gleichen Mengen eingespritzt, keine Symptome aus; sämtliche damit behandelten Tiere überlebten. — Friedberger und Castelli berichteten übrigens schon zu einer Zeit, wo diese Zusammenhänge noch völlig unklar waren, daß Antityphussera vom Kaninchen in Dosen von 0,05 bis 1,0 ccm pro 100 g Körpergewicht Meerschweinchen akut töten können; die hammelhämolytische Funktion haben diese Autoren nicht untersucht.

daß man trachtet, den Eiweißkörper, der als Träger der gedachten Antigenwirkungen fungiert, in Lösung überzuführen, eventuell zu reinigen und seine chemisch-physikalischen Eigenschaften zu ermitteln. In letzterer Hinsicht konnte bisher nur gezeigt werden, daß verschiedene Zellen (Pferdeniere, Hammelerythrocyten) ihre antigenen Fähigkeiten durch Kochen oder durch lange Behandlung mit absolutem Alkohol, also durch eiweißkoagulierende Agenzien nicht verlieren; ob nicht doch Abschwächungen eintreten, läßt sich nach den experimentellen Daten nicht beurteilen, dürfte aber nach eigenen Erfahrungen als wahrscheinlich anzunehmen sein.

Zwecks Herstellung einer brauchbaren, von corpusculären Elementen freien Antigenlösung versuchten wir zunächst, antigenreiche Gewebe mechanisch durch Verreiben mit Quarzsand und Kieselgur zu zertrümmern und das antigene Eiweiß aus den Zellfragmenten unter Anwendung hohen Druckes auszupressen (Buchnersche Presse).

Bei der Wahl des Ausgangsmateriales ließen wir uns vor allem durch die Resultate unserer (in einer früheren Publikation mitgeteilten) Titrationsversuche leiten, in denen der Antigengehalt verschiedener Organe bei verschiedenen Tieren durch das Bindungsvermögen gemessen worden war, das sie gegenüber dem hammelhämolytischen Amboceptor eines Pferdenierenantiserums entfalteten. In zweiter Linie war natürlich der Umstand maßgebend, ob sich das betreffende Substrat leicht und in größeren Mengen beschaffen ließ. Beide Bedingungen wurden durch Gewebe (Herz, Lunge, Niere, Hoden) vom Meerschweinchen oder durch die Niere des Pferdes gleich gut erfüllt. Wir haben jedoch Meerschweinchenorgane nur zu einer Versuchsserie herangezogen, in allen anderen Fällen ausschließlich Pferdeniere benutzt, um das Ergebnis der Prüfung auf den Antigengehalt der verschiedenen Präparationen einwandfreier zu gestalten. Diese Prüfung erfolgte nämlich in der Regel in der Weise, daß Kaninchen von 3 bis 4 kg Körpergewicht zweimal in einem Abstand von 6 Tagen mit der gleichen Dosis des zu untersuchenden Präparates intravenös injiziert wurden; nach weiteren 8 Tagen wurde ein ausgiebiger Aderlaß aus der Ohrvene ausgeführt, das gewonnene Serum abgehebert, inaktiviert und untersucht:

1. auf seinen Gehalt an Hammelamboceptor (Reaktionsvolumen 2 ccm, 0,05 ccm Meerschweinchenkomplement, 0,5 ccm konzentrierte Hammelblutsuspension, fallende Mengen des inaktiven Immunserums; Reaktionszeit: 2 Stunden bei 37°);

2. auf seine Toxizität für Meerschweinchen von 180 bis 200 g bei intravenöser Injektion.

Nun ist es ohne weiteres klar, daß die Meerschweinchen-toxizität eines Antiserums nicht mehr ganz eindeutig ist, wenn man zur Immunisierung des betreffenden Kaninchens Meerschweinchenorgane oder ein aus denselben hergestelltes Produkt verwendet. Man muß bedenken, daß solche Substrate Meerschweinchenerythrocyten enthalten, daß daher im Kaninchen Hämolysine für letztere entstehen können, und daß die Giftigkeit solcher Antisera dann nicht auf einen Amboceptor für das unspezifische Zelleiweiß des Meerschweinchens zurückzuführen, sondern als Spezialfall des Gesetzes von Belfanti und Carbone aufzufassen wäre, wonach das Serum eines Tieres A auf eine Spezies B als Noxe wirkt, wenn man A mit den Erythrocyten von B vorbehandelt hat. Diese Fehlerquelle kann bekanntlich auch dadurch nicht völlig ausgeschaltet werden, daß man die Meerschweinchenorgane möglichst von Blut befreit, wie das in Versuch 1 geschehen; daher zogen wir später — wie erwähnt — Pferdeniere als Ausgangsmaterial vor. Andere Details der Technik und ihre Begründungen werden sich an der Hand der Ergebnisse leichter erläutern lassen.

Versuch 1.

Preßsäfte und Preßrückstände von blutfreien Meerschweinchenorganen.

Fünf große Meerschweinchen von 400 bis 500 g Gewicht wurden aufgespannt, in die linke Jugularis eine Kanüle eingebunden und so lange warme Ringersche Lösung eingeleitet, bis dieselbe aus einem eröffneten Gefäß der rechten Körperhälfte vollkommen klar abfloß. Hierauf wurde von allen fünf Tieren Herz, Lunge und Niere, von zweien auch die Hoden und Muskelpartien entnommen, die Organe mit der Schere zerkleinert, in Reibschalen mit Quarzsand möglichst fein zerrieben und mit Kieselgur bis zur Konsistenz einer Pasta versetzt; letztere wurde in der Buchner-Pressen einem Drucke von 400 Atmosphären ausgesetzt.

Das Gesamtgewicht der Organe belief sich auf 70 g, das Gewicht des Preßrückstandes auf 190 g, das Volumen des Preßsaftes betrug 25 ccm. Jedem Gramm Organ entsprach somit 0,36 ccm Preßsaft und 2,7 g Preßkuchen.

Mit dem Preßsaft wurden zwei Kaninchen intravenös immunisiert. Das eine Nr. 945 bekam pro dosi 0,009 ccm entsprechend 0,025 g Meerschweinchenorgan; mit dieser Gewebsmenge hatten wir wiederholt (vgl. die früheren Arbeiten) gute immunisatorische Effekte erzielt, so daß die Anwendung eines äquivalenten Preßsaftvolumens als Minimum indiziert erschien, um eine eventuelle quantitative Antigenausbeute feststellen zu können. Kaninchen Nr. 937 erhielt die 20fachen Dosen (0,18 ccm = 0,5 g Organ).

Für den Fall eines negativen Resultates wurde ein drittes Kaninchen Nr. 962 eingestellt, dem in zwei Injektionen je 0,08 g Preßrückstand gleich 0,025 g Meerschweinchenorgan in die Venen eingeführt wurde. Zu diesem Behufe verrieben wir das abgewogene Quantum des trockenen Preßkuchens zu Staubform, schlämmten in phys. NaCl-Lösung auf und injizierten die ganze Suspension samt Quarzpartikeln und Diatomeenschalen; das Kaninchen vertrug ebenso wie die Tiere 916 und 914 im Versuch 2 den Eingriff ohne sichtbare Zeichen einer krankhaften Störung.

A. Kaninchen Nr. 945.

31. X.: Probeaderlaß. Das Serum hatte vor dem Versuch folgenden Amboceptor titer für Hammelerythrocyten: 0,06 +++¹⁾, 0,04 +, 0,02 Null.

31. X.: 0,009 ccm Preßsaft intravenös.

6. XI.: 0,009 " " "

14. XI.: Aderlaß.

Amboceptor für Hammelerythrocyten: 0,008 +++ , 0,006 ++, 0,002 +, 0,001 Spur.

Toxizität: Meerschw. 10: 3 ccm intravenös. Keine Symptome.

B. Kaninchen Nr. 937.

31. X.: Probeaderlaß.

Amboceptor vor dem Versuch: 0,1 +++ , 0,08 ++, 0,06 +, 0,04 Null.

31. X.: 0,18 ccm Preßsaft intravenös.

6. XI.: 0,18 " " "

14. XI.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,004 +++ , 0,002 ++, 0,001 Spur.

Toxizität: Meerschw. 11: 3 ccm intravenös. Keine Symptome.

C. Kaninchen Nr. 962.

31. X.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,1 +++ , 0,08 ++, 0,06 +, 0,04 Null.

31. X.: 0,08 g Preßkuchen intravenös.

6. XI.: 0,08 g " "

¹⁾ Bei den Amboceptor-Titrationen bedeutet: +++ komplette, ++ partielle, + Spur, Null keine Hämolyse. Die komplett lösende Grenz dosis ist fett gedruckt; ebenso ist die für Meerschweinchen eben noch akut tödliche Serummenge in jeder Versuchsreihe markiert.

14. XI.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,0008 +++, 0,0006 ++, 0,0004 Spur, 0,0002 Null.

Toxizität: Meerschw. 12: 3,0 ccm intravenös; heftige Dyspnoe, erholt sich nach 5 Min.

Das Resultat läßt sich in wenige Sätze zusammenfassen. Das Serum der mit Preßsaft immunisierten Kaninchen war für Meerschweinchen überhaupt nicht giftig geworden; der Amboceptor für Hammelerythrocyten hatte zwar eine deutliche Steigerung erfahren, die jedoch bei Nr. 945 nur das 7,5fache, bei Nr. 937 das 25fache der Norm betrug, somit als relativ unbedeutend zu bezeichnen war. Dagegen konnte bei dem mit Preßrückstand behandelten Kaninchen Nr. 962 sowohl eine gewisse Serumtoxizität, als auch eine Vermehrung der Hammelamboceptoren auf das 125fache beobachtet werden. Leider unterließen wir es, ein viertes Kaninchen mit höheren Dosen Preßkuchen zu injizieren; indes gewinnt man doch den Eindruck, als ob sich nur Spuren des Antigens auspressen lassen und als ob der Hauptanteil in der komprimierten Masse retiniert würde. Deutlich spricht sich dieses Verhalten aus im folgenden

Versuch 2.

Preßsäfte und Rückstände einer Pferdeniere.

Eine frische, von der Schlachtbank bezogene Pferdeniere wurde von der Kapsel, dem Hilusfett, den Anteilen des Pelvis und der Kelche befreit, fein faschiert und der Brei auf einem Sieb mit Leitungswasser abgospült, um die Hauptmenge des Blutes zu entfernen. 200 g, mit Quarzsand und Kieselgur verrieben, kamen in die Buchner-Presse.

Der Preßkuchen wog 400 g, der Preßsaft betrug 100 ccm; es entsprach also jedem Gramm Pferdeniere 0,5 ccm Preßsaft oder 2 g Preßrückstand.

A. Kaninchen Nr. 908.

7. X.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,04 +++, 0,02 +, 0,01 Null.

7. X.: 0,025 ccm Preßsaft (= 0,05 g Pferdeniere) intravenös.

18. X.: 0,025 " " (= 0,05 g ") "

21. X.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,0006 +++, 0,0004 ++, 0,0002 Null.

Toxizität: Meerschw. 1: 2,0 ccm intravenös; nach etwa 15 Min. somnolent, erholt sich nach 20 Min.

Meerschw. 2: 1,6 ccm intravenös. Keine Symptome.

B. Kaninchen Nr. 907.

7. X.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,08 +++ , 0,06 ++ , 0,04 + , 0,02 Null.

7. X.: 0,25 ccm Preßsaft (= 0,5 g Pferdeniere) intravenös.

13. X.: 0,25 " " (= 0,5 g ") " "

21. X.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,0004 +++ , 0,0002 ++ , 0,0001 Null.

Toxizität: Meerschw. 4: 1,0 ccm intravenös. † in 5 Min.

" 5: 0,8 " " † " 10 "

Lungenödem.

" 6: 0,6 " " Geht nach 35 Min.

unter Krämpfen ein.

C. Kaninchen Nr. 916.

7. X.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,04 +++ , 0,02 + , 0,01 Null.

7. X.: 0,1 g Preßkuchen (= 0,05 g Pferdeniere) intravenös.

13. X.: 0,1 g " (= 0,05 g ") " "

21. X.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,00005 +++ , 0,00004 ++ , 0,00002 Null.

Toxizität: Meerschw. 7: 1,0 ccm intravenös. † in 4 Min.,

Lungenödem.

" 8: 0,3 " " † in 8 Min.,

Lungenödem.

" 9: 0,2 " " Stirbt nach 1 $\frac{1}{2}$ Std.,
ohne vorher besondere Symptome ge-
zeigt zu haben.

D. Kaninchen Nr. 914.

7. X.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,04 +++ , 0,02 + , 0,01 Null.

7. X.: 1 g Preßkuchen (= 0,5 g Pferdeniere) intravenös.

13. X.: 1 g " (= 0,5 g ") " "

21. X.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,00002 +++ , 0,00001 ++.

Toxizität: Meerschw. 30: 0,2 ccm intravenös. † in 6 Min.

" 31: 0,16 " " † in 10 Min.

" 32: 0,1 " " † in 1 Std.

Zusammenfassende Tabelle.

Kaninchen Nr.	Immunisiert mit	Immuni- sierungsdosis bezogen auf Pferdeniere g	Steigerung des Hammel- amboceptors	Akut letale Dosis des Immunserums ccm
908	Preßsaft	0,05	66 fach	> 2,0
907	"	0,5	133 "	0,8
916	Preßrückstand	0,05	666 "	0,3
914	"	0,5	2000 "	0,16

Es kann demnach keinem Zweifel unterliegen, daß die Pressung nach vorausgegangener Zerkleinerung nur geringe Antigenmengen aus dem Gewebe in Lösung bringt. Ob dabei auch die adsorbierende Wirkung des Kieselgurs eine Rolle spielt, mag dahingestellt bleiben. Jedenfalls ist das Verfahren mühsam und umständlich, und wir ersetzten dasselbe daher durch eine einfachere und meist bessere Ausbeuten liefernde Technik. Vorher benutzten wir den erübrigten Rest des in dem vorstehenden Experimente gewonnenen Preßsaftes, um die Auszahlbarkeit des gesuchten Eiweißantigens mittels Ammonsulfat zu untersuchen.

Versuch 3.

Nicht ganz 100 ccm des in Versuch 2 dargestellten Pferdenierenpreßsaftes wurden mit Ammonsulfat bei Ganzsättigung gefällt, der Niederschlag auf gehärtetem Filter gesammelt, dann wieder gelöst, die Lösung filtriert und mit dem gleichen Volumen konzentrierter Ammonsulfatlösung versetzt (Halbsättigung).

Es entstand abermals ein Niederschlag, der abfiltriert wurde (Globuline); das Filtrat, bei Ganzsättigung präzipitiert, lieferte einen zweiten Niederschlag (Albumine). Die mit „Globuline“ und „Albumine“ bezeichneten Fraktionen der Eiweißkörper des Preßsaftes wurden nunmehr in je 200 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst, so daß jeder Kubikzentimeter Flüssigkeit $\frac{1}{2}$ ccm Preßsaft oder 1 g Pferdeniere entsprach.

A. Kaninchen Nr. 974.

11. X.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,02 +++ , 0,01 +.

11. X.: 0,5 ccm Globulinlösung intravenös.

17. X.: 0,5 " " "

25. X.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,0006 +++ , 0,0004 ++ , 0,0002 + , 0,0001 Spur.

Toxizität: Meersch. 35: 1,4 ccm intravenös. † in 3 Min.

" 36: 0,6 " " † in 5 "

" 37: 0,4 " " † in 6 "

" 38: 0,3 " " Keine Symptome.

" 39: 0,2 " " " "

B. Kaninchen Nr. 930.

13. X.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,04 +++ , 0,02 + , 0,01 Null.

13. X.: 0,5 ccm Albuminlösung intravenös.

17. X.: 0,5 " " "

25. X.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,006 +++ , 0,004 ++ , 0,002 Null.

Toxizität: Meersch. 40: 2,4 ccm intravenös. Keine Symptome.

Das nicht artspezifische Antigen der Pferdeniere wird demnach durch Halbsättigung mit Ammonsulfat nahezu quantitativ ausgefällt, verhält sich also wie ein Globulin.

Eine besondere Methode zur Gewinnung von Organeiweiß hat bekanntlich J. Pohl angegeben¹⁾; er nennt seine Organextrakte, die nur mehr Eiweißkörper enthalten, die von denen des Blutserums gänzlich verschieden sind, Organplasma, ein Name, der die Beziehung zum Protoplasma und die Homologie zum Blutplasma andeuten soll. Als wesentliche Voraussetzung der Darstellung eines brauchbaren Organplasmas bezeichnet Pohl das vollständige Freisein der zur Präparation verwendeten Organe von Blutbestandteilen, wie es durch eine gründliche Durchspülung der Gefäße mit einer calciumfreien, 0,8^o/_oigen Kochsalzlösung erreicht werden kann. Für die weitere Verarbeitung empfiehlt der Autor zwei Modifikationen:

Für qualitative Untersuchungen genügt es, das völlig entblutete Organ zu einem Brei zu zerkleinern, eventuell durch Siebe durchzupressen und den mit entsprechenden Mengen physiologischer Kochsalzlösung nach Toluolsalz tüchtig durchgeschüttelten Organbrei 24 Stunden in der Kälte stehen zu lassen. Dann wird filtriert, die ersten Anteile des Filtrats sind gewöhnlich trüb, nach wiederholtem Zurückgießen auf das Filter erhält man aber schließlich völlig klare, in ihrem Aussehen an Blutserum erinnernde Lösungen.

Für quantitative Arbeiten ist es besser, den Organbrei auf Glasplatten im Ventilator bei Zimmertemperatur rasch zu trocknen. Die getrockneten Pulver verwahrt man über konzentrierter H₂SO₄ bis zum Moment des Bedarfes. Zur weiteren Verarbeitung wird das Organpulver in der Pulvermühle mit physiologischer NaCl-Lösung zerrieben und in 1^o/_oiger Lösung nach Toluolzusatz 24 Stunden stehen gelassen, sodann klar filtriert.

Wir haben, da es sich vorerst nur um eine Orientierung handeln konnte, das erste der angeführten Verfahren auf die Pferdeniere angewendet, und vermochten uns nun in der Tat zu überzeugen, daß relativ große Mengen Zellantigen in das Organplasma übergehen.

¹⁾ Vgl. auch H. Wiener, diese Zeitschr. 1913.

Versuch 4.

Eine frische, von der Schlachtbank beschaffte Pferdeniere wurde von der Haupt- und den Nebenarterien aus mit Kochsalzlösung durchspült und hierauf von der Kapsel, vom Fett und von den bindegewebigen Anteilen des Nierenbeckens befreit. Das Parenchym wurde zerhaakt, die Stückchen nochmals (behufs gründlicherer Entfernung des Bluteiweißes) gewaschen und sodann in der Reibschale fein zerrieben. Der Brei, dessen Gewicht 300 g betrug, erhielt einen Zusatz von 900 ccm NaCl-Lösung und 100 ccm Toluol, und kam in mehrere weithalsige Pulvergläser gefüllt für 4 Stunden in den Schüttelapparat. Nach weiterem 20 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde bis zur völlig klaren Beschaffenheit des Filtrates filtriert. 3 ccm Organplasma waren aus 1 g Pferdenierenbrei gewonnen worden.

Kaninchen Nr. 970.

21. XI.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,3 +++, 0,2 ++, 0,1 +, 0,08 Spur.

21. XI.: 1,5 g Organplasma¹⁾ (entspr. 0,5 g Pferdeniere) intravenös.

27. XI.: 1,5 g " (" 0,5 g ") "

5. XII.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,00002 +++, 0,00001 Null.

Toxizität: Meerschw. 62: 0,4 ccm intravenös. † in 3 Min.

" 63: 0,3 " " † in 8 "

" 64: 0,2 " " Stirbt protra-

hiert in 50 Min.

Aus den Organplasmen konnte Pohl durch verdünnte (0,1 bis 0,2⁰/₁₀ige) Essigsäure, besonders sicher nach Zusatz kleiner Mengen gesättigter Kochsalzlösung (5 bis 6 ccm auf 100 ccm Plasma) einen flockig ausfallenden Körper gewinnen, der im Gegensatze zur Säurefällung aus verdünntem Serumglobulin in Neutralsalzen unlöslich war, und den er als Essigsäurekörper bezeichnete. Er erwies sich als optisch inaktiv, war durch Diffusion nicht fällbar, durch Pepsin bis auf kleine Reste vollkommen verdaulich, für Tiere bei intravenöser Injektion ungiftig und zeigte eine sehr merkwürdige Koagulationstemperatur; er gerann bei 38 bis 39⁰ vollständig, ja selbst bei 35⁰ und partiell noch bei tieferer Temperatur. Blutserum oder Bluteiweißkörper hoben die Koagulierbarkeit oder hemmten sie; dieser hemmende Einfluß ließ sich durch Zusatz von Calcium zum Blutserum paralysieren.

¹⁾ Diese Mengen erwiesen sich nicht immer als wirksam (vgl. Kaninchen Nr. 920), selbst wenn das Verhältnis von Nierenbrei und NaCl das gleiche war. Vielleicht spielt die stärkere oder schwächere mechanische Zertrümmerung der Nierenzellen eine Rolle.

Um zu erfahren, ob nicht dieser Essigsäurekörper der Träger der Antigenwirkung des Organplasmas sei, verfahren wir wie folgt:

Versuch 6.

150 ccm Organplasma + 9 ccm konzentrierte Kochsalzlösung wurden mit einigen Tropfen 0,2%iger Essigsäure versetzt. Es entstand eine Trübung, die sich rasch zu einem flockigen Präcipitat verdichtete, das nach 3 stündigem Stehen auf gehärtetem Filter gesammelt, zweimal mit NaCl-Lösung, dann einmal mit heißem destilliertem Wasser gewaschen und schließlich in 150 ccm $\frac{2}{10}$ -Kalilauge gelöst wurde. Die Lösung wurde mit Essigsäure soweit neutralisiert, daß der Essigsäurekörper eben noch nicht ausfiel; sie sei im folgenden mit E.-K. bezeichnet. Jeder Kubikzentimeter derselben entsprach etwa 1 ccm Organplasma.

Das nach Entfernung des durch Essigsäure erzeugten Niederschlags aus dem Organplasma resultierende Filtrat wurde mit den verschiedenen Waschwässern des Niederschlags vereint. Die Flüssigkeit, mit etwas KOH in ihrer Acidität nahe bis zur Lackmusneutralität abgestumpft, maß 215 ccm; 2,2 ccm derselben — sie sei E.-F. genannt — waren aus 1,5 ccm Organplasma dargestellt.

Kaninchen Nr. 965.

22. XI.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,1 +++, 0,08 +.

22. XI.: 1,5 ccm E.-K. (= 1,5 ccm Organplasma) intravenös.

28. XI.: 1,5 " " (= 1,5 " ") " "

6. XII.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,0002 +++, 0,0001 ++.

Toxizität: Meerschw. 65: 0,8 ccm. † in 3 Min.

" 66: 0,6 " † " 15 " Lungenödem.

" 67: 0,4 " † " 6 Min.

" 68: 0,2 " Keine Symptome.

Kaninchen Nr. 929.

22. XI.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,3 +++, 0,2 +, 0,1 Spur.

22. XI.: 2,2 ccm E.-F. (= 1,5 Organplasma) intravenös.

28. XI.: 2,2 " " (= 1,5 " ") " "

6. XII.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,02 +++, 0,01 +.

Toxizität: Meerschw. 69: 2,4 ccm intravenös; keine Symptome.

Ergänzend sei bemerkt, daß beide Fraktionen (E.-K. und E.-F.) des Pferdenierenplasmas prozentuell gleichviel Eiweiß enthielten, nämlich 2⁰/₁₀, was durch besondere Proben konstatiert worden war. Kaninchen Nr. 929 hatte demnach sogar mehr Eiweiß intravenös erhalten als Nr. 965, und doch war nur bei letzterem die Bildung eines hammelhämolytischen und für

Meerschweinchen toxischen Antikörpers erfolgt. Man erhält daher den Eindruck, daß das Antigen, das diesem Antikörper korrespondiert, aus dem Organplasma durch Essigsäure quantitativ gefällt wurde und daß es somit mit dem „Essigsäurekörper“ identisch sein dürfte. Um diese Vermutung zu erhärten, wurde die Koagulierbarkeit der Pohlischen Eiweißverbindung bei niedriger Temperatur herangezogen, eine Eigenschaft, die jedenfalls als die am meisten charakteristische angesehen werden darf.

Versuch 7.

200 g Pferdeniere, zerhackt und gewaschen, wurden durch ein Nickelsieb mit breitem Porzellanpistill passiert, mit 760 ccm NaCl-Lösung und 80 ccm Toluol versetzt, in Pulvergläser gefüllt, 4 Stunden geschüttelt 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann durch Papier bis zur völligen Klarheit filtriert.

Das Filtrat trübte sich im Wasserbad bei 38° stark, gab aber keinen Niederschlag. Nun hat ja Pohl selbst angegeben, daß die Anwesenheit von Bluteiweiß die Koagulation des Essigsäurekörpers verhindert, daß aber dieser hemmende Einfluß durch Calcium beseitigt werden kann. Unser Filtrat war nicht ganz serumfrei, da sich eine exakte Durchspülung bei den Pferdenieren, die wir uns verschaffen konnten, nicht durchführen ließ; es war daher naheliegend, die mangelhafte Koagulation auf Reste von Bluteiweiß zurückzuführen. Da ein weiterer Vorversuch ergab, daß 0,5% CaCl₂ im Organplasma, das wir in Händen hatten, an sich keine Veränderung hervorrief, so versetzten wir 200 ccm desselben mit 10 ccm 10% CaCl₂ und erwärmten neuerlich im Wasserbad auf 38°.

Nunmehr erfolgte eine ausgiebige Gerinnung in Form von mächtigen Flocken. Dieses Präcipitat wurde auf gehärtetem Filter gesammelt und gewaschen; es war in Wasser, 0,85% iger Kochsalzlösung, in verdünnter Essigsäure unlöslich, in $\frac{1}{10}$ -KOH löste es sich nur zum geringsten Teile. Zum Zwecke des Versuchs suspendierten wir es in 200 ccm physiologischer Kochsalzlösung, so daß jedes Kubikzentimeter einem gleich großen Volum Organplasma und etwa 0,26 g Pferdeniere entsprach. Wir wollen diese Suspension, um ihre Gewinnung anzudeuten, Wärmekörper = WK nennen.

Das nach dem Abfiltrieren des „Wärmekörpers“ restierende Filtrat (WF = Wärmefiltrat) war eiweißreich und gab auf Zusatz geringer Menge 0,2% Essigsäure keine Fällung. Die quantitativen Beziehungen zum Ausgangsmaterial und zum Organplasma waren dieselben wie beim „Wärmekörper“.

Kaninchen Nr. 920.

26. I.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,06 +++, 0,04 +, 0,02 Null.

26. I.: 3 ccm Organplasma intravenös.

1. II.: 3 " " "

9. II.: Aderlaß.

Ein f. d. Art nicht spezifisches Eiweißantigen zellulären Ursprunges. 271

Amboceptor: 0,0008 +++, 0,0006 +++, 0,0004 ++, 0,0002 Spur.

Toxizität: Meerschw. 70: 2,5 ccm intravenös. † in 20 Min.

" 71: 1,5 " Legt sich auf die Seite;

Dyspnoe, erholt sich.

9. II.: 6 ccm Organplasma intravenös.

15. II.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,0004 +++, 0,0002 ++, 0,0001 Null.

Toxizität: Meerschw. 72: 1 ccm intravenös. † in 6 Min.,
Lungenödem.

Meerschw. 73: 0,5 ccm intravenös. Starke Dyspnoe, erholt sich.

Kaninchen Nr. 934.

26. I.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,3 Null.

26. I.: 3 ccm Wärmekörpersuspension intravenös.

1. II.: 3 " " "

9. II.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,002 +++, 0,001 +, 0,0008 +, 0,0006 Spur.

Toxizität: Meerschw. 74: 3,5 ccm intravenös. Somnolent;
Dyspnoe, erholt sich.

9. II.: 6 ccm Wärmekörpersuspension intravenös.

15. II.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,0004 +++, 0,0002 Null.

Toxizität: Meerschw. 75: 2,0 ccm intravenös. † in 7 Min.,
Lungenödem.

Meerschw. 76: 1,0 ccm intravenös. † in 25 Min.

Kaninchen Nr. 959.

26. I.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,06 +++, 0,04 +++, 0,02 Null.

26. I.: 3 ccm Wärmefiltrat intravenös.

1. II.: 3 " " "

9. II.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,04 +++, 0,02 +++, 0,01 fast +++, 0,008
+++, 0,006 Spur.

9. II.: 6 ccm Wärmefiltrat intravenös.

15. II.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,006 +++, 0,004 +, 0,002 Null.

Toxizität: Meerschw. 77: 2,0 ccm intravenös. Keine Symptome.

Das Antigen war demnach durch die Koagulation bei 38° ausgefallen, und zwar nahezu quantitativ (Unwirksamkeit des Filtrates); sein Eiweißträger bot also auch dieses Kriterium des von Pohl beschriebenen Organeißes. Trotzdem sich das bei 38° geronnene Eiweiß weder in Wasser noch in Kochsalz, noch

in sauren oder alkalischen Flüssigkeiten löste, trotzdem also die Gelphase irreversibel war, blieben doch die Antigenfunktionen, die dem ungeronnenen Körper anhafteten, erhalten und zeigten höchstens eine gewisse graduelle Abschwächung (Wirksamkeit der als „Wärmekörper“ bezeichneten Fraktion des Organplasmas bei Kaninchen Nr. 934). Dieses Ergebnis steht im besten Einklang mit unseren früheren Angaben, nach denen gekochte Pferdeniere beim Kaninchen Hammelamboceptoren und toxische Antikörper für Meerschweinchen erzeugt; auch konnten wir uns überzeugen, daß die Hammelamboceptoren eines Pferdenieren-Antiserums durch gekochte Pferdeniere ebenso *in vitro* gebunden werden wie durch rohe. Diese zuerst von uns veröffentlichten Beobachtungen über die Resistenz des Organantigens gegen eiweißkoagulierende Agenzien (Kochen, Alkohol) wurden dann von anderer Seite (Sachs und Nathan, Friedberger) bestätigt.

Versuch 8.

Dialysierbarkeit des Antigens.

Verschiedene Mengen (2 bis 5 ccm) der schwach alkalischen Lösung des Essigsäurekörpers aus Pferdenierenplasma wurden in Schleicher'sche Diffusionshülsen Nr. 579 A gefüllt und ca. 16 bis 24 Std. bei Zimmertemperatur gegen 20 ccm destilliertes Wasser dialysiert. Die Außenflüssigkeit enthielt nach beendeter Dialyse Cl und gab mit 0,2% Essigsäure eine schwache Trübung. Kaninchen Nr. 984 erhielt den Inhalt, Kaninchen Nr. 992 die Außenflüssigkeit.

Kaninchen Nr. 984.

10. XII.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,3 Null.

10. XII.: 2 ccm E.-K. dialysiert, intravenös.

16. XII.: 2 " " " "

24. XII.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,006 +++, 0,004 ++, 0,002 Spur.

Toxizität: Meerschw. 200: 2,0 ccm. Keine Symptome.

25. XII.: 5 ccm E.-K. dialysiert, intravenös.

31. XII.: Aderlaß.

Toxizität: Meerschw. 208: 2,0 ccm intravenös. † in 8 Min.

" 209: 1,6 " " † " 3 "

" 210: 1,4 " " † " 12 Std.

" 211: 1,0 " " Keine Symptome.

Amboceptor: 0,004 +++, 0,002 f. +++, 0,001 ++.

Kaninchen Nr. 992.

10. XII.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,3 Null.

10. XII.: Dialysat (Außenflüssigkeit) von 2 ccm E.-K. intravenös.
16. XII.: " " " 2 " " "
24. XII.: Aderlaß.
Amboceptor: 0,006 +++, 0,004 Spur, 0,002 Null.
Toxizität: Meerschw. 201: 2,0 ccm intravenös. Keine Symptome.
25. XII.: Dialysat von 5 ccm E.-K. intravenös.
31. XII.: Aderlaß.
Amboceptor: 0,004 +++, 0,002 ++, 0,001 +.
Toxizität: Meerschw. 202: 2,4 ccm intravenös. † in 7 Min.
" 203: 2,0 " " Schwerste Symptome. † in einigen Stunden.
Meerschw. 204: 1,6 ccm intravenös. † in 22 Min.
" 205: 1,4 " " Keine Symptome.

Das antigene Nucleoprotein scheint demnach dialysabel zu sein im Gegensatz zu den Serumeiweißkörpern, für welche die benutzten Hüllen undurchlässig waren, wie eine vorhergehende Prüfung gezeigt hatte.

Der Essigsäurekörper verschiedener Organplasmen gibt nach Pohl typische Orcinreaktion, enthält somit eine Pentose; auch ließ sich in demselben nach Salzsäurehydrolyse ein Purin nachweisen. Pohl und Hammarsten rechnen ihn daher zu den Nucleoproteiden im chemischen Sinne des Wortes, womit nicht gesagt ist, daß er etwa ausschließlich in den Zellkernen vorkommt. Die Tatsache, daß es sich um ein Nucleoprotein handelt und die glatte Löslichkeit des Essigsäurekörpers in $\frac{1}{10}$ -KOH, legten den Gedanken nahe, diesen Stoff aus der Pferdeniere durch direkte Extraktion mit schwächeren oder stärkeren Laugen und Fällung mit Essigsäure darzustellen, eventuell auch zu reinigen. Es zeigte sich jedoch, daß eine 5%ige Natronlauge das Organeiweiß der Pferdeniere bis zum Verschwinden jedes antigenen Effektes denaturierte. Ein mit $\frac{1}{10}$ -NaOH gewonnener Auszug gab, mit Essigsäure gefällt, allerdings ein Produkt, das hochwertige Hammelamboceptoren und eine intensive Serumtoxizität beim Kaninchen hervorrief; löste man dasselbe aber in gleich schwacher Lauge auf, fällte wieder mit Essigsäure, so war nach 2 bis 3 maliger Wiederholung der Prozedur das Antigen destruiert oder doch in den geprüften Quantitäten nicht mehr nachweisbar. Damit steht eine Erfahrung im Einklang, die wir schon bei der Lösung des aus Organplasma gewonnenen Essigsäurekörpers in $\frac{1}{10}$ -KOH gemacht hatten; unter-

ließen wir es, diese Lösungen in ihrer Alkalinität abzustumpfen, so schien nach länger dauernder Aufbewahrung eine Abschwächung der Antigenfunktion einzutreten. Doch sind wir vorläufig nicht in der Lage, hierüber sichere Aufschlüsse zu geben.

Versuch 9.

40 g Pferdenierenbrei werden in 175 ccm 5% NaOH aufgeschwemmt und 48 Std. stehen gelassen. Nach Entfernung der Organpartikel mit Hilfe eines Porzellansiebes erfolgt die Fällung durch Zusatz von Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion. Der Niederschlag wird abfiltriert und in 160 ccm $\frac{1}{10}$ -KOH gelöst; 2 ccm = 0,5 Pferdeniere.

Kaninchen Nr. 927.

17. XII.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,8 Null.

17. XII.: 2 ccm des beschriebenen Präparates intravenös.

23. XII.: 2 " " " " "

31. XII.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,004 +++, 0,002 ++, 0,001 Null.

Toxizität: Meersch. 92: 2,0 ccm intravenös. Keine Symptome.

8. I.: 2 ccm des beschriebenen Präparates intravenös.

9. I.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,006 +++.

Toxizität: Meersch. 93: 2,0 ccm intravenös. Keine Symptome.

Versuch 10.

150 g Pferdenierenbrei werden in 400 ccm $\frac{1}{10}$ -KOK verteilt und 24 Std. stehen gelassen. Sodann Entfernung der Organpartikel durch ein Porzellansieb. Fällung mit Essigsäure.

Niederschlag abfiltriert und in 1050 ccm $\frac{1}{10}$ -KOH aufgelöst (N_1).

Diese Lösung wird filtriert und abermals mit Essigsäure gefällt; der Niederschlag in 200 ccm $\frac{1}{10}$ -KOH gelöst, die Lösung nach Zusatz von 600 ccm Wasser durch Papier filtriert, das Filtrat abermals mit Essigsäure gefällt, der Niederschlag behufs Reinigung mit NaCl-Lösung gewaschen (unlöslich) und abermals in 1050 ccm $\frac{1}{10}$ -KOH gelöst. Von dieser Lösung (N_2) entsprechen 3,5 ccm = 0,5 g Pferdeniere.

Kaninchen Nr. 967.

11. XII.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,3 +++, 0,2 +.

11. XII.: 3,5 ccm (= 0,5 g Pferdeniere) der Lösung N_1 intravenös.

17. XII.: 3,5 " (= 0,5 g ") " " " "

25. XII.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,0001 +++, 0,00008 ++, 0,00006 Null.

Toxizität: Meersch. 94: 1,0 ccm intravenös. † in 3 Min.

" 95: 0,4 " " † " 9 "

" 96: 0,2 " " Keine Symptome.

Kaninchen Nr. 931.

15. XII.: Probeaderlaß.

Amboceptor: 0,3 ++, 0,2 Null.

15. XII.: 3,5 ccm der Lösung N₂ intravenös (= 0,5 g Pferdeniere).

21. XII.: 3,5 " " " " " (= 0,5 g ").

29. XII.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,002 +++, 0,001 Spur.

Toxizität: Meerschw. 98: 2,0 ccm intravenös. Leichte Somnolenz.

29. XII.: 3,5 ccm N₂ intravenös.

4. I.: Aderlaß.

Amboceptor: 0,002 +++, 0,001 f. +++, 0,0006 +.

Toxizität: Meerschw. 99: 2,0 ccm intravenös. Leichte Somnolenz.

Der aus Pferdenierenplasma gewonnene antigene „Essigsäurekörper“ war nicht giftig. Meerschweinchen von 200 g Gewicht vertrugen 2 bis 4,5 ccm der in Versuch 6 verwendeten Lösung intravenös ohne jedes Zeichen einer Störung. Kaninchen haben wir wiederholt 3 bis 5 bis 12 ccm intravenös injiziert.

Die weitere serologische Prüfung ergab ebenfalls noch einzelne bemerkenswerte Einzelheiten.

Zunächst präparierten wir Meerschweinchen subcutan mit 0,01, 0,1 und 2 ccm der in Versuch 6 benutzten Lösung des Essigsäurekörpers aus Pferdenierenplasma (E.-K.) und prüften sie nach ca. 3 Wochen mittels intravenöser Reinjektion 1. auf das Bestehen einer aktiven Überempfindlichkeit gegen die zur Sensibilisierung verwendete Lösung, 2. auf die Überempfindlichkeit gegen Pferdeserum.

Versuch 11.

Meerschw. 101: Sensibilisiert am 9. XII. subcutan mit 2 ccm E.-K. reinjiziert am 31. XII. intravenös mit 2 ccm E.-K. Keine Symptome.

Meerschw. 102: Sensibilisiert am 9. XII. subcutan mit 2 ccm E.-K., am 31. XII. 4,5 ccm E.-K. intravenös. Keine Symptome.

Meerschw. 103: Sensibilisiert am 9. XII. subcutan mit 2 ccm E.-K., reinjiziert am 31. XII. mit 0,5 ccm Pferdeserum intravenös. Leichte anaphylaktische Reaktion, das Tier fällt aber nicht um und erholt sich in wenigen Minuten.

Meerschw. 104: Sensibilisiert am 9. XII. subcutan mit 0,1 ccm E.-K., reinjiziert am 31. XII. intravenös mit 0,5 ccm Pferdeserum. Keine Symptome.

Meerschw. 105: Sensibilisiert am 9. XII. subcutan mit 0,01 ccm E.-K., reinjiziert am 31. XII. intravenös mit 0,5 ccm Pferdeserum. Keine Symptome.

Das heißt: 1. Die Lösung des Essigsäurekörpers enthielt nur minimale Spuren anaphylaktogenes Pferdeeiweiß (Serumeiweiß des Pferdes); 2 ccm präparierten gegen Pferdeserum bei optimaler Inkubation etwa so wie 0,00001 bis 0,0001 ccm Pferdeserum, 0,01 bis 0,1 ccm überhaupt nicht. 2. Auf Meerschweinchen wirkt der Essigsäurekörper selbst nicht als anaphylaktisches Antigen, entsprechend unseren früheren Angaben, wonach auch das Ausgangsmaterial (Pferdeniere) bei dieser Tierespezies keine Produktion von Hammelamboceptoren oder toxischen Antikörpern auslöst, da das Antigen in allen Zellen enthalten ist, demnach nicht als körperfremdes Eiweiß zur Geltung kommt.

Weiter erscheint es von Interesse, daß der Essigsäurekörper keine Präcipitine zu bilden scheint.

Kaninchen 970 erhielt am 21. XI. sowie am 26. XI. 1,5 ccm Organplasma aus Pferdeniere.

Das am 5. XII. gewonnene Serum enthielt einen lytischen Amboceptor für Hammelbluterythrocyten vom Titer 0,00002 ccm, tötete Meerschweinchen (200 g) noch in einer Dosis von 0,2 ccm, präcipitierte jedoch weder Organplasma noch eine aus demselben dargestellte (neutralisierte!) Lösung des Essigsäurekörpers.

Das Kaninchen erhielt dann am 9. XII. 3 ccm E.-K., am 15. XII. 11 ccm E.-K. und am 21. XII. 10 ccm E.-K. — Das durch Aderlaß am 29. XII. erhaltene Immuneserum präcipitierte weder Meerschweinchen noch Pferdeserum, ebensowenig Organplasma aus Pferdeniere oder Meerschweinchenorganen, noch auch die zur Immunisierung benutzte Lösung des Essigsäurekörpers trotz mannigfacher Variation der Mischungsverhältnisse.

Kaninchen 965 erhielt intravenös am 22. und 28. XI. 1,5 ccm E.-K.; am 6. XII. erster Aderlaß; am 9. XII. 5 ccm, am 15. und 21. XII. je 12 ccm E.-K.; am 29. XII. zweiter Aderlaß. Die Sera von beiden Aderlässen präcipitierten die im vorstehenden Absatze angeführten Arten von Eiweißlösungen gleichfalls in keiner der geprüften Verdünnungen (1:1, 1:10, 20, 30, 40, 80, 160, 320, 640).

Die Eignung zur Präcipitinbildung variiert nun bei verschiedenen Kaninchen ganz außerordentlich nach der Individualität; die negativen Resultate bei zwei Immuntieren können daher nicht als beweisend gelten, und wir werden die Frage behufs definitiver Klärung einer genaueren Untersuchung unterziehen müssen¹⁾. Es ist aber auffallend, daß alle bisher an-

¹⁾ Die injizierten Eiweißmengen waren in den obigen Versuchen jedenfalls viel zu gering. Artfremdes Serum, von dem man, um Präci-

geführten, mit Pferdeniere oder ihren Derivaten hergestellten Immunsera (auch die von Kaninchen 970 und 965, die länger mit E.-K. behandelt worden waren) nur lytische Amboceptoren für Hammelerythrocyten, aber fast nie Agglutinine für diese Blutkörperchenart enthielten; waren Agglutinine da, so war ihre Menge so gering, daß 0,3 bis 0,5 ccm Serum erforderlich schienen, um 2 ccm 5^o/_oige Erythrocytensuspension auszuflocken eine Wirkung, die auch normales Kaninchenserum besitzen kann. Dieses Verhalten wurde bei den hammelhämolysierenden Organantisera zuerst von Forssman und Hintze, später auch von Friedberger, Doerr und Pick beobachtet. Es scheint also bei der nahen Verwandtschaft von Agglutination und Präcipitation tatsächlich eine Unfähigkeit des Essigsäurekörperantigens zur Bildung „koagulierender“ Antikörper vorzuliegen; richtiger sollte man das so ausdrücken, daß man sagt: beim Vermengen dieses Antigens mit seinem Antiserum bleibt das physikalische Phänomen der Flockung aus. Die meisten Autoren geben ja einen Unterschied zwischen Präcipitin und Eiweißamboceptor nicht zu; nun bildet aber Pferdeniere oder ihr Essigsäurekörper einen Amboceptor, der sich in vitro mit seinem Antigen verbindet (Komplementablenkung), und wenn dabei die längst als sekundär erkannten Flockungsvorgänge fehlen, so kann das nicht nur von der Beschaffenheit des Antikörpers, sondern auch von der Natur des Antigens, der elektrischen Ladung seiner Eiweißteilchen, dem Vorhandensein von Schutzkolloiden in den Antigenlösungen usw. bedingt sein.

Ferner konstatierten wir, daß das Verhalten der Kaninchen gegen das antigene Nucleoprotein der Pferdeniere einigermaßen von den sonst zu beobachtenden Eigentümlichkeiten der Produktion anderer Antikörper (Agglutinine, Lysine, Präcipitine) abweicht. Vor allem reagieren die Kaninchen auf das antigene Nucleoprotein sehr gleichmäßig. Bei Anwendung geeigneter Substrate ist uns nie ein Versager unterlaufen, und dort, wo wir ein individuelles Unvermögen zur Amboceptorbildung vermuteten, ergab die Wiederholung der Immunisierung an einem zweiten Tier nach dem gleichen Schema ein mit dem früheren

pitine zu bekommen, 1 bis 2 ccm einspritzt, enthält 10^o/_o Eiweiß; das Organplasma (mit Essbach geprüft) hatte nur 4^o/_{oo} bzw. 2^o/_{oo} der wirklichen Proteinfraction, also 25mal weniger.

auffallend übereinstimmendes Resultat. Schon nach einer einzigen intravenösen Injektion entsprechender Dosen erhält man wirksame Antisera; zwei Einspritzungen mit einem 6tägigen Intervall liefern nach Ablauf einer Woche Sera von maximalem Amboceptorgehalt und intensivster Toxizität. Was mit der zweiten Einspritzung eines bestimmten antigenen Substrates erreicht wurde, konnte jedoch nicht weiter gesteigert werden. Hatte das Antigen einen starken Immunisierungsreiz gesetzt und war das Serum der Kaninchen 8 Tage nach der zweiten Antigenezufuhr hochwertig geworden, dann zog die weitere methodische Immunisierung stets ein Absinken des Serumtiters nach sich, und das frühere Niveau konnte nicht wieder hergestellt werden; das war auch dann der Fall, wenn wir Tiere, die lange (3 bis 6 Wochen) geruht hatten, wieder injizierten, in der Hoffnung, Immunsera von der früheren Wirksamkeit zu erzielen. War das antigenhaltige Substrat infolge seiner besonderen Beschaffenheit nicht besonders geeignet, die Immunkörperbildung in Gang zu bringen, und ergab der Aderlaß 8 Tage nach der zweiten Injektion niedrige Serumwerte, so ließen sich dieselben auch durch wiederholte Einspritzungen nicht in die Höhe treiben (Kaninchen Nr. 927 und 931).

Die vorliegenden Untersuchungen über das antigene Nucleoprotein der Pferdeniere sind nicht als abgeschlossen zu betrachten; wir haben aber geglaubt, die Ergebnisse schon jetzt mitteilen zu sollen, weil sich das allgemeine Interesse seit den Arbeiten von Obermayer und Pick den nicht-artspezifischen Eiweißantigenen zugewendet hat. Durch diese Autoren wurde bekanntlich gezeigt, daß eine Reihe von Eingriffen (Nitrieren, Jodieren, Diazotieren) artspezifisches Eiweiß derart verändern kann, daß es die Artspezifität völlig einbüßt; diese Angaben wurden von Freund und in jüngster Zeit auch von Landsteiner und Prášek bestätigt und in mehrfacher Hinsicht ergänzt. Landsteiner und Prášek wiesen auch nach, daß es gar nicht so tiefgreifender Prozeduren bedarf, um die Artspezifität zu zerstören, sondern daß die einfache Behandlung mit alkoholischen Säuren genügt, um ähnliche Effekte wie Obermayer und Pick zu erzielen. Ferner fanden v. Knaffl-Lenz und Pick, daß Plasteine, die durch einen fermentativ-

synthetischen Prozeß entstehen, keine Artspezifität aufweisen, daß sie jedoch antigen wirken und Präcipitine erzeugen, die nicht nur mit dem zur Vorbehandlung benutzten Plastein reagieren, sondern auch mit Plasteinen, die aus peptischen Abbauprodukten der Eiweißkörper anderer Tiere hergestellt worden waren. In allen Fällen trat an Stelle der Artspezifität eine neue, indem die mit den veränderten Antigenen gewonnenen Immunsera nicht mehr mit dem Ausgangsmaterial, sondern nur mit gleichartig beeinflussten Eiweißantigenen (Nitroeiweiß, Säureeiweiß, Plastein) reagierten, eine Spezifität, die man je nach der Natur des vorgenommenen Eingriffes und je nach der Auffassung vom Wesen des Prozesses als konstitutive, als Zustands- oder Strukturspezifität bezeichnet hat. Auch solche Antigenmodifikationen, deren Antisera bei gewahrter Artspezifität doch nicht mehr mit der Muttersubstanz der Antigenmodifikation, sondern nur mehr mit letzterer reagieren, sind bekannt geworden. Wir begnügen uns, auf diesen ganzen Komplex zusammengehöriger Fragen und Tatsachen hinzuweisen, und können uns eine eingehende Erörterung um so mehr ersparen, als die Arbeiten von Obermayer und E. P. Pick, E. P. Pick¹⁾, v. Knaffl-Lenz und E. P. Pick²⁾, Landsteiner und v. Prášek³⁾ alle erforderlichen Aufschlüsse bieten.

Die im Organismus unter natürlichen Verhältnissen vorkommenden nicht-artspezifischen Eiweißantigene, die Linsensubstanz des Auges (Uhlenhuth), die Horngebilde (Krusius), das Amyloid (Raubitschek) stehen vielleicht, was den Mechanismus ihrer Entstehung anlangt, zu den angeführten künstlich erzeugten Antigenderivaten in naher Beziehung (E. P. Pick, Krusius, Landsteiner und Prášek). Ob auch das antigene Nucleoproteid, mit dem sich unsere Versuche beschäftigen, in diese Kategorie gehört, ist jedoch zum mindesten zweifelhaft.

Krystallinse, Hornstoffe und Amyloid verdanken ihre eigentümlichen Antigenfunktionen einem Umwandlungs-(Degenerations-)Prozeß artspezifischer Eiweißantigene, der ebenso wie die Einwirkung von Jod, HNO₃, Säurealkohol zum Untergang der Artspezifität und zur Entstehung einer Strukturspezifität führen

¹⁾ Biochemie der Antigene.

²⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 71.

³⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 20, Heft 3.

kann; diese Strukturspezifität kommt darin zum Ausdruck, daß die Linsen aller Tiere, Horngebilde der verschiedensten zoologischen Provenienz, Amyloid von Mensch und Kaninchen biologisch gleichwertig sind. Das läßt sich nun ebensowenig wie die Organspezifität, die durch eine Gleichheit der Funktion bedingt sein soll, auf das Organantigen übertragen, von dem hier die Rede ist. Dieses Antigen findet sich eben nicht in ein und demselben Organ der verschiedensten Tiere, so daß man einen bestimmten Stoffwechselvorgang (Abbauprozesse, Synthesen, Bildung intermediärer Produkte) für sein Vorkommen verantwortlich machen könnte; vielmehr kann es wie beim Pferd, beim Meerschweinchen, beim Hund, bei der Katze, der Schildkröte, beim Huhn usw. in allen Organen, wenn auch in wechselnden Mengen, auftreten. Daß es bei allen von den genannten Tieren in den Blutkörperchen fehlt, dem einzigen kernlosen Gewebe, könnte in Konnex mit dem Umstande, daß das Antigen die Eigenschaften eines Nucleoproteids zeigt, auf den Gedanken bringen, daß seine Verteilung im Körper durch den Kerngehalt bestimmt wird. Diese Kombination wird jedoch dadurch hinfällig, daß die Hammelblutkörperchen anscheinend viel von dieser Substanz beherbergen, während die Gewebe des Hammels frei sind. Eine Ableitung des Stoffes aus gleichsinnigen Zellfunktionen oder Eiweißmetamorphosen wird auch dadurch erschwert, daß sich Zellen verwandter Tierspezies verschieden, Zellen weit voneinander entfernter Arten, ja Tier- und Pflanzenzellen wenigstens qualitativ gleichartig verhalten.

Muß daher auch die Frage nach der Genese des Stoffes in suspenso bleiben, so erscheint es doch wichtig, daß durch die vorstehenden Experimente die nucleoproteidartige Natur eines Eiweißantigens wahrscheinlich gemacht wird. Wells sprach sich noch vor kurzem sehr skeptisch über die Möglichkeit aus, daß Nucleoproteine eine Spezifität besitzen können, die für die Zelle, aus der sie kommen, oder für den Nucleoproteinkomplex selbst charakteristisch wäre. Er hält es für unbegründet, anzunehmen, daß die bei den verschiedenen Präparationen erhaltenen „Nucleoproteine“ tatsächlich in der lebenden Zelle als solche existieren; da ferner die Komponenten des Nucleins (Nucleinsäure und Histone oder Protamine) nicht antigen sind, so erklärt er das Fehlen antigenen Eigen-

schaften auch bei den Nucleinen für wahrscheinlich, und folgert weiter, daß das antigene Vermögen und die Spezifität eines „Nucleoproteins“ eben nur vom beigefügten Protein bedingt werden. Diese Beweiskette dürfte doch nicht ganz einwandfrei sein; aus nichtantigenen Komponenten (Peptonen) können antigene Substanzen (Plasteine) aufgebaut werden, und durch die Versuche von Landsteiner und Prášek wird es andererseits klar, daß schon sehr geringfügige Veränderungen am Eiweißmolekül tiefgreifende Umgestaltungen der Spezifität bewirken. Abgesehen davon kommt dem Nucleoproteid der Pferdeniere tatsächlich eine besondere Spezifität zu; daß es in den Zellen wirklich enthalten ist, geht daraus hervor, daß es mit einer so schonenden Extraktionsmethode gewonnen werden kann, mehr noch daraus, daß das lebende Meerschweinchen auf das Antiserum des Nucleoproteids nur unter der Voraussetzung mit krankhaften Symptomen reagieren kann, daß seine Körperzellen den antigenen Stoff beherbergen.

Das Nucleoproteid koaguliert bei 35 bis 38°, also bei Temperaturen, wie sie im Organismus der Warmblüter herrschen; so wie aber seine Wärmegerinnung in vitro durch Bluteiweißkörper verhindert werden kann, so dürfte sie auch im lebenden Gewebe durch gleiche oder ähnliche Einflüsse gehemmt werden. Es ist jedoch sehr wohl möglich, daß sich diese Verhältnisse ändern, wenn das antigene Nucleoproteid der Zelle vom Antikörper getroffen wird und sich mit demselben verbindet; vielleicht ist hier die Ursache der am Meerschweinchen beobachteten Chok-Erscheinungen zu suchen. Damit begibt man sich indes auf rein hypothetisches Gebiet; ob sich diese Vermutungen verifizieren lassen, sollen weitere Untersuchungen ergeben.

Zusammenfassung.

1. Durch Immunisierung von Kaninchen mit Pferdeniere erhält man Sera, die lytische Amboceptoren für Hammelerythrocyten enthalten (Forssman) und auf Hunde, Meerschweinchen, Hühner bei intravenöser Injektion toxisch einwirken (Doerr und Pick).

2. Die Zellen der Pferdeniere enthalten demnach ein Antigen, das, da es sich auch in anderen Geweben des Pferdes,

ferner bei Hammel, Huhn, Schildkröte, Paratyphusbacillen usw. vorfindet, weder art- noch organspezifisch ist.

3. Dieses Antigen läßt sich durch mechanische Zertrümmerung und Auspressen von Pferdenierengewebe unter hohem Drucke nur in geringen Mengen in Lösung bringen; die Pohl'sche Methode der Darstellung von Organplasma liefert dagegen bisweilen eine befriedigendere Ausbeute.

4. Das Eiweißantigen kann durch Halbsättigung mit Ammonsulfat, durch stark verdünnte Essigsäure (0,2^o/o), durch Erwärmen auf 38^o ausgeflockt werden; die Gerinnung bei so niederen Temperaturen erfolgt nur bei Abwesenheit von Serum-eiweiß. Salz- und Essigsäurefällung sind vollkommen reversibel, die Wärmefällung nicht; alle bewahren das antigene Vermögen, durch die Koagulation bei 38^o wird es nur unbedeutend abgeschwächt. Das Eiweißantigen ist in höherem Grade dialysabel als die Eiweißantigene des Blutserums.

5. Nach seinen Eigenschaften ist das Antigen der Pferdeniere mit dem von Pohl beschriebenen Essigsäurekörper des (betreffenden) Organplasmas identisch, mithin in chemischer Beziehung ein Nucleoproteid.

6. Es wirkt auf Meerschweinchen nicht anaphylaktogen und erzeugt im Kaninchen keine Hämagglutinine für Hammelerythrocyten, wahrscheinlich auch keine gegen sich selbst gerichteten Präcipitine.

Über die Bestimmung des Chlors im Blutserum.

Von

S. Gutmann und F. Schlesinger.

(Aus dem Chemischen Institut [Prof. Dr. Löb] und der I. inneren Abteilung des Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhauses [Direktor Prof. Dr. Kuttner] zu Berlin).

(Eingegangen am 11. Februar 1914.)

Die Methode der Chloranalyse in organischen Substanzen nach Carius im geschlossenen Rohre eignet sich nicht für Serum, weil die Zersetzung selbst sehr kleiner Mengen Serum lange Zeit beansprucht, und weil durch die Notwendigkeit eines neuen Einschmelzrohres für jede Bestimmung das Verfahren kostspielig ist. Diese Mängel traten besonders bei Serienanalysen zutage, die eine von Herrn Prof. Kuttner angeregte Arbeit über den Chlorgehalt im Serum von gewissen Krankheitsfällen erforderte.

Die vor kurzem von St. v. Bogdandy angegebene Methode: Zur Bestimmung der Chloride und Bromide in organischen Flüssigkeiten¹⁾ erschien uns für unsere Zwecke brauchbarer. v. Bogdandy zerstört die organische Substanz mit einem Gemisch aus rauchender Schwefelsäure, Schwefelsäure, Kupfersulfat und Kaliumsulfat, und saugt während der Oxydation Luft durch das Oxydationsgemisch. Die gebildete Salzsäure wird durch Spiralwaschflaschen absorbiert, die mit Silbernitrat und Salpetersäure beschickt sind. Die Veraschung soll, was bei der Ausführung sehr vieler Analysen sehr wichtig ist, bereits in einer Stunde beendet sein.

Bei der Nachprüfung der v. Bogdandyschen Arbeit fanden wir jedoch die Werte für normale Blutseren stets zu niedrig;

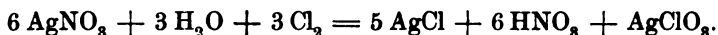
¹⁾ Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 84, Heft 1.

anstatt 0,35 bis 0,36⁰/₀ Chlor erzielten wir 0,28, 0,29 und 0,30⁰/₀. Um festzustellen, ob diese niedrigen Werte durch eine Fehlerquelle der Methodik veranlaßt waren, erhitzen wir nunmehr reine Salzsäure mit der Oxydationsflüssigkeit und fanden in der Tat einen viel zu geringen Chlorgehalt. Der Vergleich der nach v. Bogdandys Methode gefundenen Zahlen mit der direkten gravimetrischen Analyse (als Silberchlorid im Gooch-tiegel gewogen) ergab:

Oxydation im Apparat von v. Bogdandy	Direkte Fällung
1. 0,2648 g AgCl	1. 0,3066 g AgCl
2. 0,2408 g "	2. 0,3065 g "

Die Ursache der Differenz ist die folgende:

Da die zweite Gaswaschflasche, die nach v. Bogdandys Vorschrift angeschlossen war, keine Trübung von Silberchlorid zeigte, war die Möglichkeit, daß Salzsäure unabsorbiert entwich, ausgeschlossen. Hingegen hat v. Bogdandy übersehen, daß Salzsäure nach seinem Verfahren — und diese Fehlerquelle besteht wohl bei allen nassen Verfahren mit starken Oxydationsmitteln — zu Chlor oxydiert wird, das mit Silbernitrat wasserlösliches Chlorat bildet gemäß der Formel:



Eine Umwandlung des Silberchlorates in Silberchlorid im salpetersauren Filtrate bei Gegenwart von einem Überschuß von Silbernitrat ist quantitativ nur sehr schwierig durchführbar, wenn nicht unmöglich.

Neben diesem prinzipiellen Fehler sind weitere Mißstände der v. Bogdandyschen Methode, wie die Schwierigkeit, die Salzsäure vollständig in einer Operation in die Absorptionsflasche zu saugen, von geringer Bedeutung. Wir beobachteten z. B., daß nach beendeter Oxydation, die wir noch $\frac{1}{2}$ Stunde länger fortsetzten als v. Bogdandy vorschreibt, eine neu beschickte Absorptionsflasche nicht zu vernachlässigende Mengen von Silberchlorid zeigte, wenn man den Veraschungsrückstand mit Wasser versetzte und weiter erhitze.

Die v. Bogdandysche Methode ist also nicht anwendbar. Hingegen erwies sich die folgende Modifikation der bekannten trockenen Veraschung als zweckmäßig:

Wir versetzten 10 ccm Serum mit $\frac{1}{2}$ g Soda, erhitzen auf dem Wasserbade zur Trockne und veraschten dann vorsichtig. Die Abweichung von früheren Vorschriften besteht in der Anwendung einer sehr geringen Menge Soda; ein Überschuß hemmt die Veraschung ganz erheblich.

Eine weitere Beschleunigung läßt sich dadurch herbeiführen, daß man den nur teilweise verkohlten Rückstand nach dem Erkalten mit einigen Tropfen Wasser versetzt, weiter erhitzt und den Wasserzusatz nach einiger Zeit wiederholt. Man erreicht dadurch ein schnelleres Zerfallen des kohligen Rückstandes und eine beschleunigte Veraschung. Es ist nicht nötig zu warten, bis der Rückstand weiß geworden ist; es genügt, die noch kohlehaltige Schmelze mit heißem Wasser auszuziehen und im Filtrate das Chlor als Silberchlorid zu bestimmen.

Über die Einwirkung der stillen Entladung auf Stärke und Glykokoll.

Von
Walther Löb.

(Aus der biochemischen Abteilung des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 12. Februar 1914.)

In meinen früheren Mitteilungen über die chemische Wirkung der stillen Entladung habe ich bereits nachdrücklich auf die Verwandtschaft der Entladungsreaktionen mit wichtigen biochemischen Vorgängen hingewiesen. Nachdem, vornehmlich durch die Bemühungen des schwedischen Botanikers Lemström, die „Elektrokultur“ in der Landwirtschaft praktisch verwertbare Ergebnisse gezeitigt hat, verdienen die Versuche zur Aufklärung der in der Elektrokultur tätigen Faktoren, die ein schnelleres Wachstum und ein früheres Reifen der Pflanzen veranlassen, erhöhtes Interesse. Ausgehend von der Tatsache, daß die irdische Atmosphäre nicht nur in den Sonderzuständen der Gewitter, des Nordlichts usw., sondern stets von elektrischen Strömen durchzogen ist und innerhalb ihrer verschiedenen Schichten Träger von Potentialdifferenzen sein muß, haben die Engländer Newman im Weizenanbau und Thorne Baker in der Geflügelzucht mit Erfolg „Bestrahlungen“ mit hochgespannten Wechselströmen angewandt. Dünne Entladedrähte, die netz- bzw. käfigartig angeordnet waren, wurden durch Hochfrequenzströme gespeist, so daß von ihnen aus bis zur Erde ein gewaltiger Potentialabfall stattfand. Das Drahtsystem war natürlich gegen den Erdboden isoliert. Man erkennt, daß diese Versuchsanordnung in wesentlichen Punkten mit der stillen Entladungsform Ähnlichkeit besitzt. Besonders dürfte die Art des elektrischen Ausgleichs durch die Luft hindurch nicht sehr verschieden in beiden Anordnungen sein, wenn

es auch ungewiß ist, daß die in dem Ausgleich der stillen Entladung auftretenden ultravioletten und Kathodenstrahlen in den Anordnungen der beiden englischen Forscher gleichfalls von Bedeutung sind.

Es ist ohne weiteres verständlich, daß, obgleich elektrische Verhältnisse stets in der Atmosphäre und an der Erdoberfläche wirksam sind, die außergewöhnlichen terrestrischen elektrischen Vorgänge und die mit ihnen verbundenen biochemischen Prozesse zuerst die Aufmerksamkeit erregten. Ich erinnere an das Sauerwerden der Milch, an das Fischsterben während eines Gewitters, an die Ozonbildung, an die Vereinigung von Sauerstoff und Stickstoff usw. Es ist aber sicher, daß diese elektrischen Einflüsse jederzeit wirksam sind und einen großen, wenn auch noch unbekanntem Einfluß auf viele biochemische Prozesse ausüben. Der Aufklärung der chemischen Möglichkeiten dienten meine vor einer Reihe von Jahren begonnenen Versuche über die Wirkung der stillen Entladung. Durch die erwähnten praktischen Resultate, deren wissenschaftliche Begründung noch aussteht, ist das Arbeitsgebiet erweitert worden.

Um experimentell diese elektrischen Ausstrahlungen herzustellen, stehen verschiedene Wege zur Verfügung, von denen einen bestimmten zu bevorzugen keine Veranlassung vorliegt. Während ich zunächst bei den weiteren Versuchen, deren Gebiet noch genauer umzeichnet werden wird, die stille Entladungsform beibehalte, haben schon in früheren Jahren andere, z. B. Berg und Knauth¹⁾, Anordnungen gewählt, die den in der Landwirtschaft jetzt praktisch verwandten nahekommen. Die Genannten haben einen achteckigen Rahmen aus Draht mit Leinen überspannt und isoliert aufgehängt. Das Leinen wurde mit Chlorcalciumlösung befeuchtet, um es elektrisch leitend zu machen. Das Ganze kam mit einem Pol einer Influenzmaschine und der inneren Belegung einer Batterie von Leydenerflaschen in Verbindung, während die äußere Belegung und der zweite Pol der Influenzmaschine zur Erde abgeleitet waren. Der Rahmen gab so einen Konduktor ab, der stark Elektrizität ausstrahlte und im Versuch die Funktionen einer Gewitter-

¹⁾ Über den Einfluß der Elektrizität auf den Sauerstoffgehalt unserer Gewässer. Naturwissenschaftl. Rundschau 13, Nr. 51/52, 1898.

wolke übernahm. Die Influenzmaschine wurde durch einen Elektromotor getrieben.

Während die mit der stillen Entladung durchgeführten Synthesen der zu den Zuckern führenden Aldehyde, der Aufbau der einfachsten Eiweißspaltprodukte, wie des Glykokolls aus den auch in der Natur benutzten anorganischen Ausgangsmaterialien, ebenso die Bildung einfacher Fettsäuren bis zur Buttersäure gerade den großen Einfluß der Entladung auf die synthetisch-biochemischen Grundprozesse ausnutzten, führten mich weitere Beobachtungen zu Reaktionen, die enzymatischen Prozessen entsprachen, wie z. B. der Verzuckerung der Stärke¹⁾. Da die merkwürdigen Beschleunigungen des Wachstums von pflanzlichen und tierischen Organismen möglicherweise mit enzymatischen Vorgängen in Zusammenhang stehen, so entschloß ich mich, einerseits zu untersuchen, wie weit enzymatisch ausgelöste Vorgänge bei Fehlen des Enzyms durch die elektrische Entladung herbeigeführt werden können, andererseits festzustellen, welchen Einfluß die Entladung auf Enzyme und auf die Tätigkeit der Enzyme auszuüben vermag. Die erstere Art der Untersuchung ist eine vorwiegend qualitative, chemische Reaktionen aufklärende, die letztere besteht wesentlich in Geschwindigkeitsmessungen, um die quantitative Beeinflussung der Enzymreaktionen zu erkennen. Daß hierbei auch qualitative Einflüsse nicht übersehen werden dürfen, versteht sich von selbst. Derartige Untersuchungen habe ich vor einiger Zeit in Gemeinschaft mit Dr. Sato in Angriff genommen. Über die Resultate werden wir später berichten.

Die vorliegende Mitteilung schließt sich an meine frühere über die Hydrolyse der Stärke unter dem Einfluß der Entladung an und betrifft diese und die Spaltung des Glykokolls. Ich möchte bei dieser Gelegenheit meine Angaben über die Hydrolyse der Stärke noch in einigen Punkten ergänzen, die sich bei der Wiederholung meiner früheren Versuche teils in Gemeinschaft mit Dr. Sato ergaben. Die Veranlassung zu dieser Wiederholung waren einerseits die Möglichkeit, daß eine geringfügige Ozonbildung bei der im Vakuum durchgeführten Entladung eine Ansäuerung und dadurch eine indirekte Hydrolyse

¹⁾ Diese Zeitschr. 46, 121, 1912.

veranlaßt haben könnte, andererseits die negativen Resultate, die von einigen Forschern bei der Wiederholung der Rosenthalschen Versuche erhalten waren¹⁾. Gegenüber den noch nicht sichergestellten Resultaten mit den elektrischen Schwingungen im elektromagnetischen Kraftfeld sind die Versuche mittels der stillen Entladung stets reproduzierbar. Eine Ozonbildung oder Ansäuerung der Stärkelösung tritt hierbei unter den geeigneten Bedingungen nicht ein.

Versuchsordnung.

Die elektrische Anordnung war bei den Stärke- und Glykokollversuchen die gleiche, schon früher geschilderte²⁾. Nur wurde statt des Rotaxunterbrechers manchmal mit gleichem Erfolg ein Quecksilber-Turbinen-Unterbrecher angewandt. Den Elektrisatoren gab ich eine etwas andere Form wie früher. Sie bestanden aus gewöhnlichen Gaswaschflaschen von 17,5 cm Höhe und 3,6 cm Durchmesser. Das bis fast zum Boden reichende Gaseinleitungsrohr war in der Mitte abgeschnitten und zu einer kleinen Hohlkugel von 1,3 cm Durchmesser zugeblasen worden, so daß sie sich 10,5 cm über dem Boden der Flasche befand. Das Gasaustrittsrohr diente der Verbindung mit der Vakuumpumpe. Zwei Gefäße von der gleichen Größe und Einrichtung wurden im Versuch mit der gleichen Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit gefüllt und beide bei gleicher Temperatur an dieselbe Luftpumpe angeschlossen. Das eine Gefäß tauchte gerade mit dem Boden in eine Kochsalzlösung, in die der eine Draht des Induktoriums führte. In dieser Flasche war die Hohlkugel gleichfalls mit Kochsalzlösung gefüllt und enthielt den zweiten Draht des Induktoriums. Das Vakuum wurde mit einer guten Wasserstrahlluftpumpe auf 20 mm Quecksilber gehalten. Es ist bei allen diesen Versuchen, bei denen die stoffliche Veränderung sich auf geringe Mengen von Substanz bezieht, unbedingt erforderlich, stets mit Kontrollen zu arbeiten und nur aus den im Vergleiche sich regelmäßig ergebenden Unterschieden bindende Schlüsse zu ziehen.

Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur 18 bis 22° ausgeführt.

¹⁾ Vgl. z. B. Heimrod, Zeitschr. f. Elektrochemie 19, 812, 1913.

²⁾ Diese Zeitschr. 46, 121, 1912.

Die Hydrolyse der Stärke.

Das schon früher ermittelte Resultat, daß die Stärke in verdünnter Lösung durch die stille Entladung hydrolysiert wird, ließ sich ausnahmslos bestätigen. Die Lösungen blieben ebenso neutral wie die Kontrollösungen. Auch blieb die Prüfung auf Ozon ganz negativ. Im übrigen wäre bei der getroffenen Anordnung, selbst wenn Spuren von Ozon gebildet worden wären, durch die gemeinsame Vakuumleitung auch Ozon wohl in das Kontrollgefäß gezogen worden. Es zeigte sich in demselben aber innerhalb der Versuchszeit keine Hydrolyse.

Von besonderem Interesse war folgende Beobachtung. Die Stärkelösungen waren vor jedem Versuch frisch hergestellt, filtriert und sterilisiert worden. Es zeigte sich nun regelmäßig, daß in dem der Entladung ausgesetzten Gefäß alsbald eine geringe flockige Ausscheidung auftrat, während die Kontrollösung klar blieb. Diese Flocken blieben bestehen, wenn der Versuch auch bis zum völligen Schwinden der Jodreaktion durchgeführt wurde. Um diese Reaktion in der Lösung anzustellen, wurde die Flüssigkeit zentrifugiert und von den am Boden klebenden Flocken abgegossen. Nach nochmaligem Waschen der Flocken mit Wasser und Zentrifugieren zeigten die Flocken mit Jodlösung intensive Blaufärbung, so daß sie als blaue Fasern in der Flüssigkeit schwebten. Bei der Regelmäßigkeit der Erscheinung und der Beobachtung, daß auch andere kolloid gelöste Stoffe durch die Entladung ausgeflockt werden, eine Tatsache, auf die ich mit Dr. Sato noch zurückkommen werde, ist es nicht ausgeschlossen, daß durch die Wirkung der stillen Entladung außer der Hydrolyse der Stärke auch der entgegengesetzte Vorgang, eine Umwandlung, die vielleicht eine Polymerisation bedeutet, veranlaßt wird, und daß sich die lösliche Stärke zum Teil in die unlösliche Modifikation verwandelt. Die Eigenart der Entladung, immer die beiden Reaktionsformen, Zerlegung und Synthese, zu veranlassen, habe ich schon mehrfach betont. Sie würde sich auch wieder in dieser Erscheinung zeigen. Freilich ist es bei dem Fehlen einer Kühlung möglich, daß lokale Erwärmungen an dieser Umwandlung beteiligt sind. Wir werden auf diese Frage später zurückkommen.

Außer der Jodreaktion, die natürlich nur eine schon beendete oder fast beendete Hydrolyse der Stärke von der nicht hydrolysierten Kontrollösung sicher zu unterscheiden gestattet, wurde die Intensität der Reaktion durch quantitative Zuckerbestimmungen nach der Methode von Bertrand, durch das Maß der Osazonbildung und mehrfach auch durch die Änderung der optischen Aktivität gemessen und verfolgt.

Zur Ergänzung meiner früheren Angaben führe ich nur einen Versuch in der geschilderten Anordnung an. Je 20 ccm einer 1%igen sterilisierten und filtrierten Stärkelösung wurden in die Elektrisatoren verteilt. Die Entfernung der Glaskugel von der Oberfläche der Flüssigkeit betrug bei dieser Füllung 8,5 cm. Nach der Herstellung eines Vakuums von 20 mm Quecksilber wurde das mit einem Quecksilberturbinenunterbrecher verbundene Induktorium eingeschaltet. Die Maximalfunkenlänge betrug bei diesem Apparat 25 cm. Der Motor des Unterbrechers wurde auf die höchste Umdrehungszahl reguliert. Die Stromstärke in der Primärspule betrug 1,3 bis 1,4 Amp. Nachdem die Entladung 9 Stunden eingewirkt hatte, wurde der Versuch abgebrochen und der Inhalt des Versuchs- und des Kontrollgefäßes auf genau 100 ccm gebracht. Während die Kontrollösung vollständig klar geblieben war, hatte sich die Versuchslösung deutlich getrübt. Es wurde deshalb ein Teil der letzteren mittels der elektrischen Zentrifuge stark abgeschleudert und der am Boden des Gefäßes klebende geringe Niederschlag zweimal mit Wasser geschüttelt und nach jedesmaligem Schütteln wieder zentrifugiert. Die nunmehr zurückbleibenden Flocken färbten sich mit Jodlösung tief und rein blau, während die der Entladung ausgesetzte Stärkelösung nur einen hellen rotvioletten Farbenton mit Jodlösung zeigte. Die Kontrollösung gab die tiefblaue Reaktion der Jodstärke.

Es war also einerseits eine weitgehende Hydrolyse der Stärke durch die Entladung herbeigeführt worden, andererseits hatte sich ein kleiner Teil in unlösliche Stärke verwandelt.

Maquenne und Roux, und später Gruzewska¹⁾ haben beobachtet, daß die lösliche Amylose der Kartoffelstärke sich beim Altwerden oder unter dem Einflusse der Kälte spontan aus der Lösung ausscheidet, ein Vorgang, der als „Rückbildung“

¹⁾ Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 152, 785, 1911.

der Amylose bezeichnet wird. Vielleicht handelt es sich bei dem von mir beobachteten Phänomen um eine verwandte, aber unter der Wirkung der stillen Entladung beschleunigte Erscheinung.

Versuchs- und Kontrollösung waren vollständig neutral gegen Lackmus, die Reaktionen auf Ozon fielen negativ aus. Es ist auch verständlich, daß, wenn selbst im Gasraum geringe Mengen Ozon gebildet sein sollten, bei dem starken Vakuum, das bei der herrschenden Zimmertemperatur von 22° eine nicht unbedeutliche Wasserverdampfung veranlaßte, Ozon in wirksamen und nachweislichen Mengen nicht in die Stärkelösung gelangen konnte. Die sehr geringen Mengen Wasserstoffperoxyd, die bei langdauernden Versuchen sich nachweisen lassen, dürften für die Stärkehydrolyse vollständig belanglos sein. Man muß also die Verzuckerung der Stärke dem Einfluß der stillen Entladung zuschreiben. Wie ich schon wiederholt im Anschluß an die Arbeiten Warburgs betont habe, ist einer der chemisch wirksamsten Faktoren der stillen Entladung ihre ultraviolette Strahlung. Für die Stärkehydrolyse wird die Auffassung, daß auch hierbei die ultravioletten Strahlen mitwirken, durch die Versuche Massols¹⁾ bestätigt. Ihm gelang durch Bestrahlung einer Stärkelösung mit einer Quarzquecksilberlampe eine Hydrolyse, die nach seiner Angabe Maltose lieferte.

Wir verzichteten bei den geringen Ausbeuten auf den aussichtslosen Versuch, die entstehenden Zuckerarten zu identifizieren und begnügten uns mit quantitativen Bestimmungen der reduzierenden Zucker in Kontroll- und Versuchslösung. In dem hier geschilderten Versuch wurde die Zuckerbestimmung nach der Methode von Bertrand ausgeführt, nachdem die kolloiden Stoffe durch Behandlung mit kolloidaler Eisenoxydlösung entfernt waren. Zur Analyse wurden je 25 ccm der ursprünglich auf 100 ccm gebrachten Lösungen benutzt. Die Versuchslösung enthielt 22,4 mg reduzierenden Zucker, als Glucose berechnet, die Kontrollösung 8,0 mg. Wir haben eine größere Anzahl Versuche durchgeführt, alle mit dem gleichen Resultat. Während die Versuchslösung eine relativ reichliche Osazonausscheidung ergab, lieferte die Kontrollösung nur eine

¹⁾ Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 152, 902, 1911.

Trübung. Die Größe der Hydrolyse ist von der Versuchsdauer abhängig und läßt sich leicht bis zum völligen Schwinden der Jodreaktion durchführen.

Die Spaltung des Glykokolls.

Durch die Untersuchungen von F. Ehrlich¹⁾ wissen wir, daß sowohl der Hefe als auch einigen Schimmelpilzen die Fähigkeit zukommt, aus Aminosäuren Ammoniak abzuspalten und dabei aus α -Aminosäuren die um ein C-Atom ärmeren Alkohole oder unter Wasseranlagerung die entsprechenden Oxsäuren zu liefern. Ferner haben Chodat und Schweizer²⁾ mitgeteilt, daß sich mittels der Tyrosinase oder des Chlorophylls eine Desamidierung des Glykokolls erreichen lasse. Aus diesen und anderen Beobachtungen ist es wahrscheinlich, daß die Desamidierung des Glycins eine enzymatisch geregelte biochemische Reaktion ist. Deshalb schien es mir nach den Erfahrungen über die Stärkehydrolyse von Interesse zu untersuchen, ob die stille Entladung bei dem Glykokoll auch die durch enzymatische Wirkung erzielbare Spaltung hervorruft. Gegenüber der Stärkehydrolyse bietet diese Reaktion den Vorzug, daß sie nicht durch eine geringe Säurebildung, wie sie vielleicht unter dem Einflusse von Spuren Ozon durch Oxydationsvorgänge veranlaßt werden könnte, beeinflußt oder hervorgerufen werden kann.

Es zeigte sich in der Tat, daß die stille Entladung die Hydrolyse des Glykokolls, wenn auch nur in geringem Umfange, so doch sicher und regelmäßig hervorruft. Daß hierbei keine Oxydationswirkung vorliegt, ließ sich durch Versuche beweisen, in denen während der Entladung dauernd Sauerstoff, der natürlich zum Teil ozonisiert wird, bei gewöhnlichem Druck durch die Versuchslösung geleitet wurde. Das Maß der Spaltung des Glykokolls blieb dasselbe wie in den Versuchen unter Ausschluß des Sauerstoffs.

Die Versuche wurden in verschiedenen Anordnungen durchgeführt. Zuerst verwandte ich den bereits beschriebenen³⁾ Elektrizator von Exsiccatorform, und zwar sowohl mit der für

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 44, 139, 888, 1911.

²⁾ Diese Zeitschr. 57, 430, 1913.

³⁾ Diese Zeitschr. 46, 121, 1912.

die Stärkehydrolyse verwandten Glaskugel, welche die Kochsalzlösung als innere Elektrode enthielt, als auch unter Ersatz der Glaskugel durch eine Messingkugel, bei deren Gebrauch im Vakuum die Entladung freilich mit einem von der Metallkugel ausgehenden Lichtbüschel (Glimmentladung) vor sich ging, so daß etwas andere Bedingungen als bei der gewöhnlichen Form der stillen Entladung in diesem Falle vorlagen. Die Größe der Messingkugel und ihre Entfernung von der Versuchslösung waren dieselben wie bei der Glaskugel, der Durchmesser betrug 3,5 cm, der Abstand 3 bis 10 cm. Meist aber wandte ich die in dieser Arbeit geschilderten Elektrisatoren an. Die Versuche wurden stets mit Kontrollen durchgeführt. Die Stromstärke in der Primärwicklung des Induktoriums war 1,2 bis 1,5 Amp.

Das Verhalten der Glykokollösungen nach dem Versuch war das folgende. Bei längerer Einwirkungsdauer der Entladung zeigte die bestrahlte Lösung eine schwachsaure Reaktion gegen Lackmus, während die Kontrollösung ganz neutral blieb. Neßlers Reagens gab in der ersteren eine deutliche Ammoniakreaktion, während die letztere nur schwach gelblich gefärbt wurde. Die bestrahlte Lösung gab mit Phenylhydrazin eine Trübung, die unbestrahlte nicht. Jene zeigte positive Reaktion mit Naphthoresorcin, diese nicht. Ebenso erhielt man mit Witte-Pepton und konzentrierter Schwefelsäure die Adamkiewiczische Reaktion, die bei der Kontrollösung völlig ausblieb. Alle diese Reaktionen weisen auf die Möglichkeit der Bildung von Glyoxalsäure hin. Bei den äußerst geringen Mengen war es aber aussichtslos, diesen Befund sicherzustellen. Auch die schwachsaure Reaktion steht mit der Tatsache im Einklang, daß das glyoxalsaure Ammonium gegen Lackmus sauer reagiert. Bei diesen Schwierigkeiten wurde als Maß der Hydrolyse oder Desamidierung die quantitative Ammoniakbestimmung und nach Entfernung des Ammoniaks die quantitative Bestimmung der unveränderten Aminosäure nach der Methode von Sörensen gewählt. Zu dem Zweck wurden Versuchs- und Kontrollösungen auf gleiche Volumina gebracht und in gleichen Teilen durch Destillation mit Natronlauge das Ammoniak bestimmt, sodann wurden die ammoniakfreien Destillationsrückstände genau neutralisiert, und in ihnen mit Phenolphthalein als Indicator durch Formoltitration das unveränderte Glykokoll

ermittelt. Zu den Versuchen wurde stets 1%ige Glykokoll-lösung angewandt.

Das Resultat der Versuche, von denen einige die folgende Tabelle wiedergibt, ist der Nachweis, daß das Glykokoll durch die Wirkung der stillen Entladung zum geringen Teil desamidiert wird. Auch in diesem Falle ist es also möglich, die bei biologischen Vorgängen auftretende Reaktion, die durch rein chemische Hilfsmittel äußerst schwer realisierbar ist, lediglich durch Zufuhr einer geeigneten Energieform herbeizuführen.

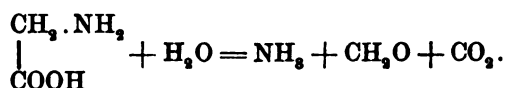
Tabelle.

Stromverhältnisse	Dauer Std.	Ammoniak		Glykokoll		Bemerkungen für die Versuchslösung
		Versuch g	Kontrolle	%	%	
Glimmentladung mit Messingkugel. Entfernung 10 cm. 20 mm Hg. Angew. 100 ccm 1%ige Lösg.	11	0,0102	Spur	0,888	0,99	Naphthoresorcin- reaktion: ++. Reaktion: sauer; 16 ccm $\frac{1}{10}$ -NaOH (Phenolphthalein).
Glaaskugel. Entfern- ung 8 cm. 20 mm Hg. Angew. 100 ccm 1%ige Lösg.	28	0,0184	Spur	0,891	0,99	Naphthoresorcin- reaktion: ++. Reaktion: sauer; 33,9 ccm $\frac{1}{10}$ -NaOH.
Glaskugel; gewöhnl. Druck unter Sauer- stoffdurchleitung. 100 ccm 1%ige Lösg.	15	0,0068	Spur	0,885	—	Qualitative Reaktionen die gleichen.
do. 100 ccm 0,915%ige Lösg.	15	0,012	Spur	—	—	do.
do. 100 ccm 1%ige Lösg.	18	0,0051	0,0022 (Bakterien?)	—	—	do.
Gaswaschflaschen- elektrisorator. 20 ccm 1%ige Lösg.	3	0,00136	—	0,975	0,99	do.

Wie man aus den mitgeteilten Daten sieht, sind die quantitativen Ergebnisse recht ungleichmäßig. Das liegt einerseits an den wechselnden Versuchsbedingungen, andererseits daran, daß bei den langdauernden Versuchen im Vakuum reichlich Wasser verdampft, wodurch vielleicht Ammoniak mit fortgerissen wird. Man tut gut, nach einigen Stunden das ver-

dampfte Wasser zu ergänzen, hat es aber ohne kompliziertere Verhältnisse nicht in der Hand, für vollständige Gleichmäßigkeit in diesen Bedingungen zu sorgen¹⁾. Da hier zunächst das qualitative Ergebnis von Interesse war, so begnügte ich mich mit den angegebenen Feststellungen.

Um den Vorgang, der sich unter der Wirkung der stillen Entladung abspielt, mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit aufzuklären, sind noch einige Beobachtungen zu berücksichtigen, die in der Tabelle nicht angeführt worden sind. Zunächst ließ sich feststellen, daß stets eine geringe Menge von Wasserstoffperoxyd gebildet wird. Das ist nach meinen früheren Untersuchungen nicht überraschend, da diese Substanz in Gegenwart von Wasser immer entstehen kann. Dann ließ sich mit Hilfe der Schryverschen Reaktion²⁾ in sehr geringem Maße auch Formaldehyd nachweisen, so daß aus diesen Befunden in Zusammenhang mit der Tatsache der positiven Naphthoresorcinreaktion und des Verhaltens gegen Phenylhydrazin eine Reihe von Prozessen wahrscheinlich ist, die alle in den biologischen Glykokollzersetzen beobachtet sind. Und zwar erstens die Hydrolyse in Ammoniak und Glykolsäure, dann die teilweise Oxydation der letzteren zu Glyoxalsäure und schließlich die Spaltung in Ammoniak, Kohlensäure und Formaldehyd:



Die Versuche werden weiter fortgesetzt, besonders nach der Richtung hin, durch Erzielung besserer Ausbeuten eine sichere Aufklärung des Spaltungsmechanismus des Glykokolls zu erzielen.

¹⁾ Einen Apparat, der durch dauernde Kühlung gegen die Verdampfung möglichst schützt, werde ich mit Dr. Sato in der angekündigten Mitteilung beschreiben.

²⁾ Vgl. Chodat und Schweizer, diese Zeitschr. 57, 430, 1913.

Die Geldrollenbildung im Blute vom kolloidchemischen Standpunkte aus.

Von
Fritz Schwyzer.

(Eingegangen am 15. Februar 1914.)

Mit 6 Figuren im Text.

Basierend auf der Theorie von den elektrischen Grenzschichten von v. Helmholtz und auf der Lehre Quinckes von der Berührungselektrizität hat Jean Perrin¹⁾ den Nachweis geführt, daß die Kolloidkörnchen durch die Suspensionsflüssigkeit elektrisch geladen werden und so einander abstoßen. Die Eigenschaft, elektrische Ladung zu erteilen, ist an den Gehalt an Elektrolyten gebunden, und ganz besonders an die H^+ - und OH^- -Ionen, also an die Hauptträger der Begriffe Säuren und Basen. Je nach dem Vorzeichen der Ionen stabilisieren oder koagulieren sie die Kolloide, wobei auch die Valenz eine Rolle spielt. Dafür stellt Perrin die Valenzregel auf: Die kleinen Ionen H^+ und OH^- bedecken die Berührungsfläche und wirken dann als Attraktion für die mehrwertigen Ionen entgegengesetzten Vorzeichens; sie verhalten sich den Polyvalenten gegenüber wie eine Beize.

Bei den organischen Kolloiden, besonders den Proteiden, ist eine komplizierte Elektrolytenlösung vorhanden, in der auch nicht-elektrolytische Krystalloide vorkommen. Die Proteide können basischer oder saurer Natur sein (auch neutral?); die Elektrolyten sind ein- und mehrwertig, zum Teil dissoziiert, zum Teil gebunden. Die letzteren haben zwar eine osmotische, nicht aber eine kontaktelektrische Bedeutung.

Im Blute sind außer Krystalloiden, Elektrolyten und Kolloidkörnchen noch die Blutkörperchen aufgeschwemmt, ge-

¹⁾ Mécanisme de l'Electrisation de Contact et les Solutions colloïdales. Journ. de Chim. Physique 1904 et 1905.

trennt vom Plasma durch eine lipoide Oberflächenschicht, in der sich stets osmotische Vorgänge abspielen, da durch den Kontakt mit verschiedenen Organen die Blutmischung fortwährend variiert. Die Konzentrationsgrade sämtlicher Elektrolyten oszillieren um eine Mittellage — zu große Abweichungen von derselben verändern die Berührungsschicht und schädigen den Inhalt der körperlichen Elemente.

Wenn nun, nach Perrin, die kontaktelektrische Ladung der Kolloidgranula im allgemeinen ein Bestehen der Kolloidaufschwemmungen ermöglicht, so muß auch auf die Blutkörperchen die Ladung einen ähnlichen Einfluß haben. Eine Entladung der Kolloidgranula führt nach Perrin zur Koagulation, d. h. zum Zusammenballen der Kolloidkörner. Bei den Erythrocyten tritt ein ähnlicher Vorgang ein, die Geldrollenbildung.

Wie durch Zauberkräfte ziehen sich, wenn wir sie auf dem Objektträger unter dem Mikroskope betrachten, die roten Blutkörperchen gegenseitig an und legen sich mit den Breitseiten zusammen. Warum tun sie das nicht im strömenden Blute, warum sind sie dort so peinlich getrennt, daß man in den Peritonealgefäßen kaum je zwei zusammengeklebt findet? Man könnte sich denken, die lebende Gefäßwand verhindere die Geldrollenbildung gerade so gut wie die Fibringerinnung. Ich dachte, Fibringerinnung und Geldrollenbildung seien zusammengehörige Erscheinungen, aber ich fand, daß Natriumcitratzusatz zwar die Gerinnung verhindert, aber unter Umständen die Geldrollenbildung nicht beeinträchtigt. Geldrollenbildung kann auch nicht mit Agglutination in Parallele gesetzt werden, sie ist vielmehr ein Spezialfall derselben. Kolloidkörner werden durch ihre elektrische Ladung vor der Agglutination bewahrt — sie stoßen sich gegenseitig ab, solange sie geladen sind. Sie kleben, wenn entladen, zusammen. Dasselbe Verhalten zeigen die Blutkörperchen. Sie stoßen sich ab, solange sie geladen sind. Man kann mikroskopisch die Abstoßung deutlich beobachten, sowohl im strömenden Blute (im Peritoneum), als auch unter dem Deckglase, wenn das Blut durch geeignete Zusätze vor der Geldrollenbildung bewahrt ist. Hört die Abstoßung auf, aus Gründen, die wir gleich erörtern wollen, dann treten andere Kräfte in ihr Recht, die Capillarkräfte, die

Flächenattraktion. Für diese ist das erreichbare Ziel intimste flächenhafte Berührung, wie sie in der Geldrollenanordnung gegeben ist. Sind durch osmotische Störung die roten Blutkörperchen gequollen, so bilden sie keine Geldrollen, wohl aber können sie in Haufen agglutinieren. Haben sie dagegen Stechapfelform angenommen, so hört Agglutination jeder Art auf, es fehlen eben die Flächen.

Es ist anzunehmen, daß die Leukocyten auch kontakt-elektrisch geladen sind und im gleichen Sinne wie die roten Blutkörperchen. Dafür sprechen mehrere Gründe: Die Leukocyten bleiben im strömenden Blute stets vereinzelt. Auch auf dem Objektträger sieht man nur selten rote Blutkörperchen daran kleben. Öfter dagegen kleben weiße aneinander, aber, wie ich hier antizipieren möchte, nur dann, wenn die Oberflächenschicht verändert ist (im Sinne einer Herabsetzung der Oberflächenspannung). Die Ladung der Leukocyten ist jedenfalls quantitativ verschieden von derjenigen der Erythrocyten. Sie scheinen noch geladen zu sein, wenn die roten Blutkörperchen schon flächenhaft sich zusammenlegen.

Wir sehen sehr verschiedene Grade der Geldrollenbildung. Manchmal hängen die Blutkörperchen nur nach Art einer umgefallenen Geldrolle zusammen, anscheinend sehr lose. Oft bilden sie Rollen von 2 bis 3 Blutkörperchen und trennen sich wieder. Und von da finden sich alle Übergänge bis zu einem ganz aus Geldrollen bestehenden Netzwerk, das in dieser Stellung Fibrin entwickelt und so erstarrt. Diese Varietäten hängen ab von der Proportion, welche besteht zwischen dem Reste der elektrischen Ladung, die abstoßend wirkt, und den Capillarkräften, die anziehen.

In der Zirkulation ist das Blut osmotisch und offenbar auch elektrisch fein ausbalanciert gegenüber der Gefäßwand und den Gewebselementen. Das Serum erteilt selbstverständlich auch dem Gefäße eine Ladung (höchstwahrscheinlich eine negative), so daß Gefäßendothel und Blutkörperchen, gleichsinnig geladen, sich abstoßen. Bringt man Blut zur mikroskopischen Untersuchung auf eine Glasplatte, so treten folgende Faktoren auf: Das Blut kommt in Berührung mit der Luft (außer wenn es mit einer Spritze direkt aus der Vene genommen wird), es kühlt sich ab, es verliert etwas Wasser durch Verdunstung,

und auf dem Objektträger kommt es mit zwei Glasflächen in Berührung, denn ohne Deckglas läßt sich frisches Blut nur schwer beobachten. Die Berührung mit der Luft ist sehr kurz, so daß die Verdunstung gering sein dürfte. Die Abkühlung kann fast ganz vermieden werden, indem man erwärmte Objektträger benutzt. Von einer chemischen Wirkung des Glases kann kaum eine Rede sein, denn das Glas ist praktisch unlöslich in einem Medium von der Zusammensetzung des Blutserums. Und doch sehen wir wenige Sekunden nach der Blutentnahme so viele Geldrollenbildungen, daß freie rote Blutkörperchen die Ausnahme bilden. Was für eine Eigenschaft des Glases bleibt übrig, nachdem thermische und chemische Wirkungen ausgeschlossen sind? Wohl nur die Berührungselektrizität. Diese ist bekanntlich zwischen Glas und Brunnenwasser beträchtlich, zwischen Glas und Serum dürfte sie ganz ansehnlich sein, da Serum bedeutend reicher an Elektrolyten ist als Wasser.

Die intensivste Geldrollenbildung zeigt sich im unverdünnten Blute zwischen Deckglas und Objektträger. Bei verdünntem Blute ist die Distanz zwischen einzelnen Blutkörperchen größer, so daß die Flächenanziehung benachteiligt, die Abstoßung begünstigt wird. Ich versuchte statt Glas andere Materialien. Die Beobachtung wird aber sehr erschwert, sobald ein nicht durchsichtiges Medium gewählt werden muß. Glimmer und Quarzglas verhalten sich ähnlich wie Glas, auch auf paraffiniertem Objektträger und unter paraffiniertem Deckglas zeigt frisches Blut starke Geldrollenbildung, ebenso auf Film von unlöslicher Gelatine. Die Beobachtung von Geldrollenbildung auf Metall ist schwierig, wenn Glas oder ein anderes durchsichtiges Material vermieden werden soll. Ich spannte dünnstes Platinblech zwischen zwei Glasklötzchen auf, die auf einem Objektträger befestigt waren, und perforierte das Blech mittels einer feinen Nadel. In den kleinen Löchern konnte man das Blut gut beobachten, auch mit Zeiß E, aber die Berührung mit Luft, störend wegen raschen Eintrocknens, war nicht auszuschließen. Am Rande des Metalles waren sehr wenige Geldrollenbildungen zu finden, im Zentrum der Löcher mehr, auf dem Bleche, so weit man sehen konnte, keine. (Beleuchtung von oben ist nur möglich bei mäßig starken Objektivsystemen.) Goldfolie, zwischen Objektträger und Deckglas, mit feinen Löchern als Beobachtungs-

stellen, schien die Geldrollenbildung wenig zu hindern.

Ich verwendete eine Reihe von Zusatzflüssigkeiten, um die Beeinflussung der Geldrollenbildung zu studieren, und brachte erst ein gemessenes Quantum der Flüssigkeit auf den Objektträger und da hinein ungefähr das halbe Volumen Blut. Später verwendete ich eine dünne Glasröhre, füllte $\frac{2}{3}$ mit Zusatzflüssigkeit, $\frac{1}{3}$ mit Blut, und spritzte dann sofort auf den Objektträger aus. Ich verfuhr dabei nach folgenden Gesichtspunkten: 1. Wenn die Geldrollenbildung eine Funktion der Osmose ist, die ja leicht zu Ionisierung führt, so müssen isotonische und anisotonische NaCl-Lösungen verschiedene Wirkungen zeigen. 2. Wenn die Fibrinbildung damit im Zusammenhang steht, so müssen verhin- dernde Zusätze die Geldrollenbildung aufheben. 3. Unterschiede der H⁺- und OH⁻-Konzentration müssen von großem Einfluß sein, wenn es sich um kontaktelektrische Vorgänge handelt. 4. Vielleicht könnten nach der Valenzregel Zusätze von mehrwertigen Ionen eine größere Wirkung zeigen, je nach der Konzentration der einwertigen. 5. Wie verhalten sich isotonische Lösungen anderer Salze gegen die Geldrollenbildung?

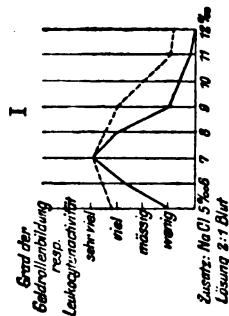


Fig. 1. Sub- bis hyperisotonisch.

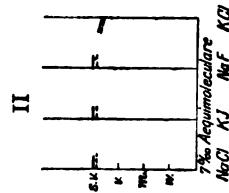


Fig. 2. Äquimolare Neutralsalzlösung.

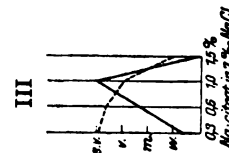


Fig. 3.

Isotonisch, aber ge- Valenzisotonisch H⁺-Konzentration erhöht. Ca⁺⁺-Zusatz rinnungshemmend. „Leukozytenaktivität“ siehe nachstehenden Artikel.)



Fig. 4.

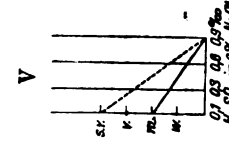


Fig. 5.

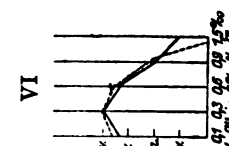


Fig. 6.

OH-Konzentration erhöht.

ad 1) Kochsalzlösungen von 5‰ bis zu 12‰ beeinflussen die Geldrollenbildung in ganz verschiedener Weise. Bei 5‰ fängt etwas Geldrollenbildung an, bei 11‰ hört sie ganz auf; bei 5 und bei 9‰ und bei 6 und bei 8‰ sind die Geldrollenformationen je gleich stark, das Optimum liegt etwa bei 7‰ . Dabei wurde stets die Verdünnung 1 Blut: 2 Flüssigkeit eingehalten (alles bei Beobachtung auf Objektträger unter Deckglas). Auf Paraffin zeigt sich bei $0,6$ und $0,7\text{‰}$ iger NaCl-Lösung enorme Geldrollenbildung. Erwärmt man das Präparat bis zum Schmelzpunkte des Paraffins (ca. 50°), so hört sofort alle Geldrollenbildung auf, wohl gestört durch das geschmolzene und wieder erstarrte Paraffin (Tabelle I).

ad 2) Zusätze von Natriumcitrat verhindern die Gerinnung, nicht aber die Geldrollenbildung. Besonders stark ist die Geldrollenformation bei 1‰ Citratzusatz in $0,7\text{‰}$ iger NaCl-Lösung. Ein Zusatz von CaCl in 9‰ NaCl stört die Geldrollenformation nicht, solange er unter 1‰ ist, begünstigt sie aber auch nicht besonders (Tabelle III und IV).

ad 3) Die Wirkung von OH^- - resp. H^+ -Konzentration läßt sich aus den Kurven ersehen. Zusatz von NaOH bei $0,1$ bis $0,6\text{‰}$ in 9‰ NaCl erhält die Geldrollenformation auf voller Höhe, während sonst in 9‰ iger NaCl-Lösung dieselbe nur mäßig ist. Säurezusatz dagegen, z. B. H_2SO_4 zu $0,1$ bis $0,9\text{‰}$, ergibt in schwächster Konzentration nur mäßige Geldrollenbildung und geradlinigen Abfall bei steigender Konzentration (Tabelle V und VI).

ad 4) Die Valenz der Ionen scheint nicht dieselbe Rolle zu spielen, wie bei der Koagulation einfacher Kolloide. Ich hatte dies auch nicht erwartet, da in dem komplizierten System von Elektrolyten und Kolloiden, genannt Serum, schon viele mehrwertige Ionen vorkommen: Fe^{++} , Fe^{+++} , Ca^{++} , Mg^{++} und die negativen SO_4^{--} , CO_3^{--} , PO_4^{---} usw. Ein Plus von SO_4 hatte nicht größeren Einfluß als man von seiner direkten Wirkung erwarten konnte. Ein Zusatz von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{---}$ und $\text{Fe}(\text{CN})_6^{---}$ trug kaum zur Erhöhung der Wirkung von HCl bei. Die chemischen Verhältnisse sind dabei eben nicht übersehbar.

ad 5) versuchte ich äquimolekulare Lösungen von NaJ, NaBr, NaF, KBr und KCl, alle entsprechend einer 7‰ igen

und einer 8⁰/₁₀₀igen NaCl-Lösung. Sie zeigten keine beträchtlichen Unterschiede gegenüber der Kochsalzlösung, selbst Fluornatrium verminderte die Geldrollenbildung keineswegs, besonders entsprechend einer 7⁰/₁₀₀igen Salzlösung (Tabelle II).

Um die Kontaktelektrische Ladung von Glas gegenüber Blut und Blutserum festzustellen, ließ ich defibriniertes Schweineblut durch eine senkrecht gestellte Glasröhre von 10 qmm Querschnitt fließen und leitete von oberhalb und von unten mittels verschiedener Elektroden, Platin, Kupfer und unpolarisierbaren Elektroden den beim Fließen entstehenden Strom ab, durch ein Verzarsches Capillarelektrometer, unter mikroskopischer Beobachtung. Die Glaswand wurde stets negativ geladen, das Blut positiv, d. h. ein Strom positiver Elektrizität bewegte sich im Blute in der Richtung des Flüssigkeitsstromes. Dasselbe konnte mit reinem Blutserum beobachtet werden. Da wir nun von vielen Materialien wie Kohle, Gelatine, Cellulose usw. wissen, daß sie in alkalischen Medien negativ geladen werden, so müssen wir annehmen, daß auch die Blutkörperchen eine negative Ladung tragen, indem alle verfügbaren OH⁻-Ionen ihre Oberfläche überziehen. Sobald nun der Blutstropfen mit einer Glasplatte in Berührung kommt, so werden eine sehr große Zahl der OH⁻-Ionen die Glasoberfläche bekleiden und damit verlieren die Blutkörperchen einen großen Teil ihrer Ladung. Vielleicht übt Glas eine größere Anziehung auf die OH⁻-Ionen aus als die Oberfläche der Erythrocyten. Wird das Blut angesäuert, so erteilt es, wie alle sauren Flüssigkeiten, dem Glase positive Ladung, und wohl auch den körperlichen Elementen des Blutes. Dann werden sich diese letzteren auch abstoßen — die Geldrollenbildung wird unmöglich — sobald die H⁺-Ionenkonzentration die OH⁻-Konzentration wesentlich übertrifft. Aber auch hier werden sehr viele Ionen zur Ladung der Glasfläche verwendet. Daher haben wir zwischen ausgesprochener alkalischer und ausgesprochen saurer Reaktion eine Zone des „Unbestimmten“, wo Geldrollenbildung vorkommt. Diese Zone, bei Verdünnung des Blutes, 1 Vol.: 2 Vol. Zusatzflüssigkeit, reicht etwa von 0,6⁰/₁₀₀ H₂SO₄ in isotonischer NaCl-Lösung bis 1,5⁰/₁₀₀ NaOH. Bei Säurezusatz ist aber die Geldrollenbildung stets eine mäßige (bei 0,1⁰/₁₀₀), bei 0,3⁰/₁₀₀ schon eine geringe. Das Optimum liegt also noch im Alkalischen.

Zusammenfassung.

Die Tendenz der Erythrocyten, in Geldrollenform zusammenzukleben, tritt im normalen Blutgefäße und in strömendem Blute nicht zutage, wohl aber, sobald ein Tropfen Blut mit Glas in Berührung kommt. Im lebenden Gefäße werden die Erythrocyten durch kontaktelektrische Ladung auseinandergehalten, — sie stoßen sich ab und werden von der Gefäßwand abgestoßen. Wird aber diese Ladung gestört, durch Verlust der OH^- -Ladung an die Glasplatte, dann hört die Abstoßung auf und wird durch die Capillarkräfte, die Flächenattraktion, überwunden. Flächenhaftes Aneinanderlagern ist dann die Folge. Der Übergang von Abstoßung zu Attraktion ist Funktion der kontaktelektrischen Ladung — je geringer diese wird, um so eher überwiegen die anderen Kräfte, die anziehenden. So wird die Geldrollenbildung ein durch die besondere Form der Blutscheiben¹⁾ bedingter Spezialfall der Ausfällung körperlicher Elemente durch Verlust der Ionisierung, ähnlich der Ausflockung von Kolloiden. Am intensivsten ist die Geldrollenbildung im unverdünnten Blute auf der Glasplatte; Verdünnungen schwächen die attrahierenden Kräfte und sind deshalb stets ein Hindernis für die Zusammenlagerung. Aber je geringer die Abweichung der kontaktelektrischen Ladung, unter Einfluß der Verdünnungsmittel, von den normalen Verhältnissen ist, um so weniger wird die Geldrollenbildung beeinträchtigt. Je mehr dagegen ein Verdünnungsmittel die OH^- -Konzentration beeinträchtigt, um so weniger Geldrollenbildung tritt ein, während mäßige OH^- -Zusätze zum Verdünnungsmittel der Geldrollenbildung günstig sind. Die Art der Neutralsalze scheint von geringer oder keiner Bedeutung zu sein, solange Isotonie erhalten wird. Alkalizusatz zu isotonischen Lösungen erhöht — Säurezusatz erniedrigt — die Aneinanderreihung. Bei höherer OH^- -Konzentration werden die Erythrocyten klebrig, ihre Oberflächenschicht wird stärker verändert und sie agglutinieren in Haufen, aber nicht in Geldrollenform.

Die Geldrollenbildung hat mit der Fibringerinnung nichts gemeinsam. Wird durch Citratzusatz oder durch NaF der

¹⁾ In Geldrollenstellung berühren sich die Blutscheiben am gleichmäßigsten und am intensivsten.

Kalk ausgefällt und dadurch eine Gerinnung unmöglich gemacht, so tritt doch Geldrollenbildung ein, falls die Isotonie erhalten blieb und die OH-Konzentration nicht wesentlich verändert wurde. — Es war mir nicht möglich, im Blute einen Einfluß der Valenz der Ionen nachzuweisen. Die Verhältnisse sind zu kompliziert.

Die Form der Erythrocyten gewinnt durch die Annahme einer Kontaktladung an Bedeutung: Die Dellen haben offenbar den Zweck, auch bei partieller Entladung ein festes Aufeinanderkleben zu verhindern. Es bleibt nämlich zwischen zwei Scheiben immer ein kleinstes Quantum Serum, genügend, um einen Teil der Ladung zu erhalten. Wird dann die Elektrolytenlösung einer stärkeren Ladung günstig, dann treten die Erythrocyten wieder voneinander. Diesen Vorgang kann man unter dem Mikroskop beobachten, wenn man die H^+ -Konzentration durch Säurezusatz (in isotonischer Flüssigkeit) erhöht, so daß die Geldrollen wenigstens zum Teil wieder auseinanderfallen. Wirbeltiere mit elliptischen Blutkörperchen sind vielleicht nicht so sehr von der Ladung abhängig, aber auch hier wird wohl die Agglutination durch diese verhindert werden.

Die Größe der Flächenattraktion könnte durch die Menge der Verdünnungsflüssigkeit, die nötig ist, um Aneinanderlagerung ganz zu verhindern, bestimmt werden. Daraus könnte dann auch ein Schluß gezogen werden auf die Größe der abstoßenden Kräfte.

Die Oberflächenspannung der Leukocyten und deren Beeinflussung.

Von

Fritz Schwyzer.

(Eingegangen am 15. Februar 1914.)

In meiner vorigen Mitteilung über die Geldrollenbildung der roten Blutkörperchen habe ich zu beweisen versucht, daß diese Aneinanderlagerung auf Störungen der normal vorhandenen, vitalen, elektrischen Ladung der Elektrocyten zurückzuführen sei. Die Leukocyten nehmen an der Geldrollenbildung keinen Anteil — sie scheinen selbst zur Zeit der Reihenbildung der Erythrocyten die letzteren noch abzustoßen. Wohl aber lagern sich die einzelnen Leukocyten, selbst verschiedener Art, aneinander an, unter Umständen, die wir jetzt näher besprechen wollen. Zur Beurteilung der Geldrollenbildung machte ich Blutpräparate zwischen Deckglas und Objektträger unter Zusatz von Verdünnungsflüssigkeiten, die z. T. nur isotonische Neutralsalzlösungen darstellten, von subisotonischer bis zu hyperisotonischer Konzentration. Andere Verdünnungsflüssigkeiten waren isotonisch, 6 bis 9⁰/₁₀₀ NaCl, mit Variationen der H⁺- und der OH⁻-Konzentration. Die Geldrollenbildung wurde sofort und nach 5 Minuten mit einem der Prädikate: „sehr stark, stark, mäßig, schwach, fehlend“ notiert. Dann wurde eine größere Anzahl weißer Blutkörperchen gesucht und ihre Oberfläche beurteilt: ob scharf konturiert, rund, ob uneben, ob wenig oder viel Pseudopodien, oder gar verschwommene, verquollene Umrisse.

Die Leukocyten haben eine vitale Contractilität, sie reagieren auf äußere Reize durch anscheinend willkürliche Veränderung ihrer Form. Vom physikalischen Standpunkte aus müssen wir aber bekennen, daß sie unter dem Gesetze der Oberflächenspannung stehen. Die Variationen der letzteren sind schon für Amöben als Ursache der Pseudopodienbildung an-

gesprochen worden. Es ist wohl schwierig, zwischen der vitalen Contraction, wie sie z. B. Muskelgewebe zeigt, und der rein physikalischen Formveränderung die richtige Grenze zu ziehen; aber für eine aktive Contraction nach Art einer Muskelzelle scheint kein Beweis vorzuliegen. Nach J. Hamburger sind lipoidlösende Agenzien die besten Reizmittel zur Phagocytose¹⁾. Chloroform 1:500000, Jodoform 1:100000, Alkohol 1:10000, Buttersäure und Propionsäure sogar 1:10000000 befördern die Phagocytose sehr stark. Hamburger glaubt nicht an eine Abnahme der Oberflächenspannung als Ursache der Phagocytose. Aber seine Versuche mit Olivenöl, Wasser und lipoidlösenden Mitteln (S. 167) scheinen mir nicht beweisend, denn aus dem Verhalten eines Tröpfchens, das durch und durch aus Olivenöl besteht, läßt sich kein Schluß ziehen auf ein Tröpfchen von gleicher Größe, bestehend aus lebendem Protoplasma und überzogen mit einer äußerst dünnen, lipoiden Schicht. Im ersteren werden die lipoidlösenden Mittel selber gelöst — die Oberfläche bleibt immer lipoidhaltig —, im letzteren dagegen kann das Lipoid, da es in so sehr kleinem Quantum vorhanden ist, wirklich gelöst und weggeschafft werden. Dann haben wir ein „nacktes“ Eiweißklümpchen auf der einen, ein lipoidlösungsmittelhaltendes Öltröpfchen auf der anderen Seite — hier eine Oberflächenschicht, die von Wasser benetzt wird, dort eine unbenetzte — hier durch die Benetzung stark herabgesetzte Oberflächenspannung, dort hohe Oberflächenspannung, die erst durch große Mengen lipoidlösenden Mittels wesentlich herabgesetzt werden könnte, z. B. durch Verseifung mittels merklichen NaOH-Gehaltes.

Ich neige also zu der Ansicht, daß die Pseudopodienbildung usw. der Leukocyten sehr viel mit Oberflächenspannung zu tun habe. Wie weit aber die eigentlich phagocytären Vorgänge darauf zurückzuführen sind, wage ich nicht zu entscheiden. Das Hereinziehen von Nahrungspartikeln ist doch ein so vitaler Vorgang, daß es einem fast widerstrebt, auch dort nur Variationen der Oberflächenspannung anzunehmen, obwohl auch da ein Einziehen der Pseudopodien, nachdem sie an einem Fremdkörper sich angeheftet haben, die Phagocytose erklären könnte. Aber dann müßte sich auch das spätere Ausstoßen unverwend-

¹⁾ Physikal.-chem. Untersuchungen über Phagocytose, 1912.

barer Reste wieder auf bloße Oberflächenfunktion zurückführen lassen, und das dürfte doch etwas schwierig sein. Das Nahrungsbedürfnis ist ein sehr komplizierter Zustand, und die Phagocytose wird z. T. davon abhängen, wobei Substanzen nach Art der Wrightschen Oponine nicht zu vergessen sind. Ich beschränkte mich also bei meinen Geldrollenversuchen darauf, die Pseudopodienbildung zu beurteilen und verzichtete darauf, durch Zählung von gefressenen Fremdkörpern eine Beurteilung der Phagocytose zu versuchen.

Zwischen der Geldrollenbildung und der Aussendung von Pseudopodien durch die Leukocyten, nennen wir diesen Vorgang der Kürze wegen „Leukocytenaktivität“, besteht nun ein auffallender Parallelismus, wie sich aus den im vorangehenden Artikel befindlichen Kurven ersehen läßt. Meist übertrifft die Leukocytenaktivität die Geldrollenbildung bei Abweichungen des tonischen Gehaltes der Lösungen. So findet sich z. B. bei 5⁰/₁₀₀ NaCl Zusatzflüssigkeit (2 Teile zu 1 Teil Blut) schon eine beträchtliche Pseudopodienbildung, während die Geldrollenbildung noch gering ist; und bei 12⁰/₁₀₀ bestehen noch einzelne Pseudopodien, während die Geldrollenbildung schon aufhört. Aber die Akme beider Kurven fällt zusammen. Bei Erhöhung der H⁺-Konzentration (Säurezusatz) sinkt die Leukocytenkurve mit der Geldrollenkurve zusammen, bei Erhöhung der OH⁻-Konzentration bis zu einem Gehalt von 0,6⁰/₁₀₀ (NaOH) bleibt sie hoch und sinkt dann allmählich ab. Dabei sind die Leukocyten unscharf konturiert, zeigen aber keine Pseudopodien mehr. Oft sind sie dann gegen die Glasfläche abgeflacht, sie kleben meistens daran fest, haben auch große Neigung, unter sich zusammenzukleben. Die Geldrollenbildung, obwohl sehr reduziert, dauert bei höherer OH⁻-Konzentration bis zu 1,5⁰/₁₀₀ NaOH. Ein Zusatz von CaCl₂ scheint dabei einen schädigenden Einfluß zu üben. Bei 0,2⁰/₁₀₀ NaOH, in 9⁰/₁₀₀ NaCl, bringt schon ein Zusatz von 0,5⁰/₁₀₀ CaCl₂ die Leukocytenkurve und die Kurve der Geldrollenbildung auf Null hinab. Vielleicht ist dies ein Zeichen, daß die Valenzregel doch auch für das komplizierte Blut gilt. Mit dem dreiwertigen Lanthanhydroxyd hatte ich keine derartigen Resultate, auch bei Zusatz in NaCl 7,5⁰/₁₀₀ mit 0,6⁰/₁₀₀ NaOH, doch ist Lanthan sehr wenig löslich.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß Oberflächenspannung

und Kontaktelektrizität voneinander abhängen. Apparate, die in der einen oder anderen Form seit vielen Jahren zur Messung kleinster Potentialdifferenzen verwendet werden (nach dem Prinzip des Lippmannschen Capillarelektrometers), basieren auf Veränderungen der Oberflächenspannung von Hg gegenüber verdünnter Schwefelsäure. Wird das Quecksilber negativ gemacht gegenüber der Schwefelsäure, so wird die Oberflächenspannung größer. Negative Körper werden in ihrer Oberflächenspannung durch positives Potential verstärkt werden, nach Analogie der Perrinschen Versuche.

Ich glaube nun aus meinen Beobachtungen folgende Schlüsse ziehen zu dürfen: Die Geldrollenbildung ist ein Resultat elektrischer Entladung, z. B. durch die Berührung mit einer Glasplatte. Parallel mit dieser Entladung geht eine Herabsetzung der Oberflächenspannung der Leukocyten. Die Entladung ist in der Hauptsache eine Funktion der OH^- - resp. der H^+ -Konzentration. Geringe Erhöhung der letzteren führt zum Aufhören der Geldrollenbildung und zur Erhöhung der Leukocytenoberflächenspannung. Der Wendepunkt scheint sehr nahe am „Neutralpunkte“ zu liegen. Erhöhung der OH^- -Konzentration wird besser ertragen und führt schließlich zu einem Ersatz der Geldrollenbildung durch Agglutination und zu unregelmäßiger Form der Leukocyten, ohne Pseudopodienaussendung, eventuell auch zu einer Haufenlagerung derselben.

Ähnlich wie die Leukocytenoberfläche wird auch die Oberfläche der Erythrocyten beeinflusst, aber in viel geringerem Maße. Leukocyten sind sehr verschieden von den roten Blutkörperchen. Während letztere eigentlich bloß die O_2 -Träger darstellen, gehören die weißen Blutkörperchen zu den aktivsten chemischen Arbeitern des Körpers. Sie produzieren unter großem Energieaufwand die kompliziertesten Eiweißverbindungen, sie haben neben der synthetischen eine mächtige abbauende Kraft. Sie brauchen daher auch einen intensiveren Schutz und haben in der Tat eine stärkere Lipoidhülle als die Erythrocyten. Deshalb können sie auch eine stärkere kontaktelektrische Ladung haben als die letzteren. Dies, neben der verschiedenen Form, erklärt, weshalb sich die Leukocyten an dem „Reigen der Geldrollenbildung“ nicht beteiligen.

Acidose und Anstrengung.

von

Fritz Schwyzer.

(Eingegangen am 7. Februar 1914.)

In der Arbeit: Stoffwechsel des Säuglings im Hunger, II. Mitteilung, berichten Schloßmann und Murschhauser (diese Zeitschr. 56, I, 496, 1913/14) u. a. über die Aceton- und β -Oxybuttersäurebildung eines Säuglings im Hunger, wobei aber Wasser und Kochsalz in genügender Menge zugeführt wurde. Hier ist also die Acidose das Resultat von Verbrauch von Körpersubstanz trotz genügender Chlorzufuhr bei sonst normalem Körper. Im Gegensatz dazu steht folgende kleine Beobachtung:

Ein junger Mensch von 20 Jahren, gesund, nicht Glucosuriker, sehr gut ernährt, relativ wenig trainiert, machte im Januar während ca. 10 Tagen ziemlich intensive Wintersportanstrengungen im Gotthardgebiet, bei Temperaturen von -5° bis -25° . Dabei, infolge der Anstrengung, viel Schwitzen und übertriebene Aufnahme von Quellwasser bei guter Ernährung, die auch für die erhöhte Kraftleistung völlig genügen mußte. Schon am 4. Tage glaubte ich in der Atemluft Aceton wahrzunehmen. Am 6. Tage intensiver Acetongeruch und starke Rotfärbung des Urins auf Zusatz von Eisenchlorid. Zu weiteren Untersuchungen hatte ich keine Gelegenheit. Ich ließ statt Quellwasser Fachinger, Selters u. dgl. konsumieren und die Arbeitsleistung vermindern. Nach einigen Tagen wurde die Acetonbildung minimal und hörte mit Aufgabe des Wintersports ganz auf. Hier war die Acidose wohl eine Folge gestörter Mineralisation, wie in Taylors Selbstversuch (Studies on an ash-free diet, Univ. of California Publ. Pathol. 17, 71), wobei er während 9 Tagen Eiweißstoffe gut ausnützte und wenig an Gewicht verlor. Aber es traten doch schwerere Störungen des Regelungsstoffwechsels ein (zitiert nach G. v. Wendt in Oppenheimers Handb. d. Biochem. 4, 616), nämlich Acidose. Grünwald (Über die Lebenswichtigkeit der Chloride für den Organismus, Centralbl. f. Physiol. 22, 500) sah Tiere bei chlorfreier Kost in verhältnismäßig gutem Zustande, bis er durch Diuretin einen weiteren Verlust an NaCl erzwang. Dann gingen sie unter schweren Vergiftungserscheinungen zugrunde. Acidose kann also, in normalen Organismen, sowohl durch Nahrungsmangel bei genügender NaCl-Zufuhr zustande kommen, als bei ausreichender Nahrung infolge von zu großen Salzverlusten, durch Schwitzen und Auswaschen des Körpers.

Ein neuer Extraktionsapparat.

Von
S. N. Pinkus.

(Aus dem Tierphysiologischen Institut der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

(Eingegangen am 10. Februar 1914.)

Mit 1 Figur im Text.

Die dem sonst vortrefflichen „Soxhlet“ anhaftenden Unzulänglichkeiten, besonders seine Unhandlichkeit, sind durch Variationen desselben Prinzips [für analytisches Arbeiten besonders die v. d. Heidesche¹⁾] bedeutend verringert worden.

Nur für Substanzen, die kein Erwärmen vertragen, also besonders beim Arbeiten mit Proteinen, die man nicht koagulieren möchte, sind keine bequemen Konstruktionen vorhanden. Die Apparate, in denen das Extraktionsgefäß mit einem besonderen Kühler umgeben ist, sind alles andere als das. Außerdem dürfte wohl auch in Fällen, wo man von einer langdauernden Extraktion absehen kann und schnell mehrere Proben hintereinander extrahieren möchte,

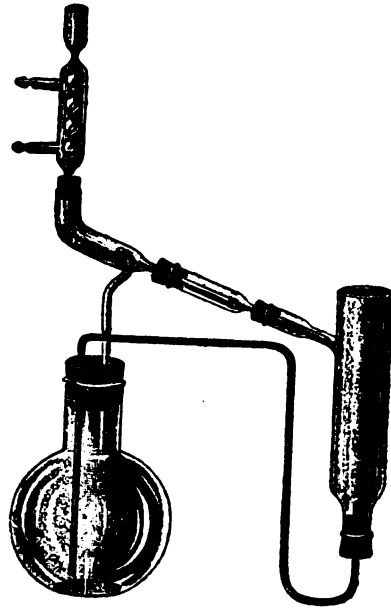


Fig. 1.

¹⁾ Zeitschr. f. Physiol. 25, 2.

ein bequemes Leeren und Beschicken des Extraktionsgefäßes erwünscht sein.

Diesen Desideraten trägt der anbei abgebildete Apparat Rechnung. Die Dämpfe des Extraktionsmittels gelangen aus dem Kolben seitlich und von oben in den zum Kühler führenden Ansatz, das Kondensat fließt dann in das außerhalb angebrachte Extraktionsgefäß, das nach Bedarf durch Einstellen in ein Becherglas mit Eis gekühlt werden kann. Es ist während der Extraktion mit einem Korken verschlossen. Das Extraktionsgut, das man in einem Drahtkörnchen oder einer Extraktionshülse hineinbringt, kann, wie ersichtlich, leicht entfernt werden, ohne daß man den Apparat abbaut.

Nach beendeter Extraktion kann man das Extraktionsmittel in demselben Apparat abdestillieren, indem man einfach den zum Extraktionsgefäß führenden Ansatz zurückzieht, ablöst, umdreht und mit einem längeren Ableitungsrohr verbindet.

Der Apparat wird von den Ver. Fabriken für Laboratoriumsbedarf, V. L. F. Berlin, Scharnhorststr. 22, hergestellt.

Über eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels nach Laparotomie.

Von

D. A. Katz und D. R. Lichtenstern.

(Eingegangen am 16. Februar 1914.)

Die Angaben Kreidls und Winklers über die nach Eröffnung der Bauchhöhle bei den Versuchstieren auftretende temporäre Glucosurie wurden von Graham Lusk angezweifelt und konnten von Ringer in seinem Laboratorium nicht bestätigt werden.

Unter Berücksichtigung des Blutzuckergehaltes konnte im Gegensatz hierzu Bang nachweisen, daß die Eröffnung der Bauchhöhle von einem erheblichen Anstieg des Blutzuckers gefolgt ist. Im Durchschnitt von 9 Versuchen war der Gehalt vor der Laparotomie $0,10\%$, 15 Minuten bis $3\frac{1}{2}$ Stunden nach derselben $0,19\%$. Zweifellos ist die Abkühlung des Darms für diese Steigerung verantwortlich zu machen. Die Operation an sich ist nicht die Ursache. Amputation einer Hinterpfote führte nur eine ganz unbedeutende Vermehrung des Blutzuckers herbei.

Die von Bang für das Zustandekommen der Hyperglykämie und der in deren Gefolge sich event. einstellenden Glucosurie herangezogene Deutung ist nach der Angabe von Winkler nicht stichhaltig. Wurde den Versuchstieren, Katzen oder Hunden, die Bauchhöhle im Wärmeschrank geöffnet und jede Abkühlung des Darmes hintangehalten, so trat trotzdem Glucosurie auf.

Fortsetzung der Untersuchungen¹⁾ lieferte den Beweis, daß das Auftreten von Glykämie resp. Hyperglykämie nach Laparotomie ein fast konstanter Befund ist. Behufs Beurteilung

¹⁾ Die Versuche wurden unter gütiger Aufsicht des Herrn Prof. D. A. Kreidl im physiologischen Institute der Wiener Universität ausgeführt. Wir sind Herrn Prof. Kreidl für seine Unterstützung zu großem Danke verpflichtet!

des Bestehens einer diabetischen Stoffwechselstörung ist, wie bereits Weinland betonte, die Harnuntersuchung allein nicht genügend, es kommt vielmehr der Bestimmung der Blutzucker-
menge eine vielleicht noch höhere Bedeutung zu. So wurde von Weinland nachgewiesen, daß nicht immer ein Zusammen-
gehen von erhöhtem Blutzuckergehalt und Zuckerausscheidung
im Harn statthat. Für letztere kommt ja ganz wesentlich
die Zuckerdichtigkeit der Niere in Betracht, die vielfachen
Schwankungen ausgesetzt ist.

Hieraus erklärt sich auch das Verhalten der verschiedenen
Tierklassen dem Eingriff gegenüber. Bereits in der Arbeit
Winklers ist hervorgehoben, daß Kaninchen nach der Ope-
ration nur selten Zucker ausscheiden. Daß aber trotzdem eine
gleichsinnige Stoffwechselstörung nach der Operation bei diesen
Tieren statthat, beweist die durch unsere Versuche festge-
stellte Erhöhung des Blutzuckergehaltes nach der Laparotomie.

Andererseits konnte das von Weinland beobachtete Nicht-
zusammengehen von Hyperglykämie und Glucosurie durch Be-
funde an Hunden bestätigt werden, indem bei einzelnen Tieren
nach der Eröffnung der Bauchhöhle sich noch Zucker im Urin
nachweisen ließ, der Gehalt des Blutes an Zucker deutliches
Sinken zeigte. So war bei einem Hunde vor der Operation
der Blutzuckergehalt $0,034\%$ und zeigte nach der Operation
trotz positiver Zuckerreaktion im Harn ein weiteres Sinken
auf $0,013\%$, in einem zweiten Fall war vorher gleichfalls ein
auffallend geringer Wert zu konstatieren gewesen, $0,017\%$
und war nachher bei Ausbleiben von Zucker im Harn auf
 $0,009\%$ gesunken, in einem dritten Fall bei nach der Lapa-
rotomie einsetzender Glucosurie war der Wert von $0,122\%$
auf $0,051\%$ gesunken.

Bei Kaninchen und Katzen war hingegen konstant ein
Anstieg des Blutzuckers nach Eröffnung der Bauchhöhle zu
verzeichnen, obwohl gerade hier die Zuckerausscheidung im
Harn sich nicht einstellte. Als charakteristische Befunde wären
die folgenden anzuführen: Bei einem Kaninchen, bei dem der
nach Laparotomie durch Expression der Blase gewonnene Harn
deutliche Fehlingsche Probe aufwies, waren die Zuckerwerte,
vorher $0,065\%$, bereits 5 Minuten nach dem Eingriff $0,225\%$
gewesen. Bei einem zweiten Kaninchen ohne Glucosurie war

nach der Operation der Ausgangswert bei dem normalen Tiere 0,068⁰/₀ gewesen, 15 Minuten nach Laparotomie betrug der Blutzuckergehalt 0,104⁰/₀, 35 Minuten nach ihr 0,109⁰/₀, 55 Minuten später 0,272⁰/₀. Analoge Zahlenwerte fanden sich bei einer Katze, die nach Eröffnung der Bauchhöhle keinen Zucker im Harn ausgeschieden hatte. Auch hier zeigte die Blutzuckerniere ein allmähliches Steigen. Vor der Operation waren im Blute 0,115⁰/₀ Zucker enthalten gewesen. 10 Minuten nachher fanden sich 0,139⁰/₀, 30 Minuten danach 0,155⁰/₀, nach 45 Minuten 0,264⁰/₀. In allen Versuchen ließ sich daher, sei es durch Untersuchung des Harns, sei es durch Untersuchung des Blutes, das Bestehen einer Abweichung des Kohlenhydratstoffwechsels feststellen.

Ob die Verminderung des Blutzuckergehaltes bei Hunden, seine Vermehrung bei Kaninchen eine konstante Erscheinung ist, müssen weitere Untersuchungen lehren. Jedenfalls beweisen die Resultate der Blutzuckeruntersuchung die Notwendigkeit der Paralleluntersuchung von Blut und Harn, um vorhandene Abweichungen des Kohlenhydratstoffwechsels festzustellen. Vielleicht würden Blutuntersuchungen beim Menschen trotz normalem Harnbefundes eine solche Störung nach der Laparotomie erkennen lassen. Mit Hilfe der in letzter Zeit ausgearbeiteten Methoden der Blutzuckerbestimmung in kleinen Blutmengen lassen sich solche Untersuchungen auch beim Menschen durchführen und sollen Gegenstand weiterer Studien bilden.

Nach Feststellung der Abweichung des Kohlenhydratstoffwechsels nach der Laparotomie wurde die Zeitdauer der auftretenden Glucosurie zu ermitteln gesucht. Unabhängig von der Intensität der Zuckerausscheidung klingt die Glucosurie im Laufe der nächsten 36 Stunden ab. Auch bei längerem Überleben der Versuchstiere konnten in verschiedenen Zeiten vorgenommene Harnuntersuchungen das dauernde Schwinden der Zuckerausscheidung konstatieren.

Das Verhalten des Blutzuckergehaltes nach der Laparotomie bei kranker Niere wurde an Hunden zu ermitteln gesucht, bei denen durch Uraninjektion tubuläre Nephritis, durch Kantharidineinspritzung vasculäre Nephritis hervorgerufen worden waren. In einem Falle leichter, bereits abklingender Urannephritis betrug der Zuckergehalt des Blutes vor der

Laparotomie $0,183\%$ und stieg nach derselben auf $0,219\%$, bei schwerer Urannephritis war ein Sinken des hohen Zuckertes von $0,342\%$ auf $0,158\%$ zu konstatieren. Im Harn war das eine Mal keine Zuckerausscheidung, das zweite Mal positive Reaktion gefunden worden. Bei Kantharidinnephritis stieg der Zuckergehalt des Blutes bei ausbleibender Glucosurie nach der Laparotomie in 20 Minuten von $0,215\%$ auf $0,372\%$.

Die Erkrankung der Niere scheint die Glucosurie insofern zu beeinflussen, daß sie auch beim Hunde nach Eröffnen der Bauchhöhle ausbleibt, selbst dann, wenn im Gegensatz zu dem Befunde am gesunden Tiere der Blutzuckergehalt ein hoher ist. Durchschneidung des Rückenmarks in verschiedener Höhe hatte beim Hunde keinen Einfluß auf den Ausfall des Versuches. In einem Versuche wurde die Höhe des Blutdruckes nach Durchschneidung des Brustmarkes bestimmt und derselbe normal befunden. Die Laparotomie hatte keinen Einfluß auf ihn genommen. Zucker war im Harn nachweisbar. Die Rückenmarksdurchschneidung hat an sich keine Glucosurie im Gefolge. Bei einem Hunde blieb der Harn während und nach derselben, aber auch nach der Laparotomie zuckerfrei.

Partielle Exstirpation der Thyreoidea hat keinen Einfluß auf die Glucosurie nach Laparotomie. Der vor der Eröffnung der Bauchhöhle entnommene Harn enthielt allerdings bei zwei Tieren geringe Zuckermengen, die Menge steigt aber nach derselben ganz erheblich an und in dem bis zum nächsten Tag aufgefangenen Harn waren $2,0\%$ bzw. $1,4\%$ Zucker gefunden worden. Auch hier war nach ca. 36 Stunden der Zucker wieder aus dem Harn verschwunden.

Injizierter Traubenzucker ruft beim normalen Tiere nur vorübergehend eine Steigerung des Zuckergehaltes im Blute hervor, nach 30 bis 50 Minuten ist mit Bestimmtheit ein Absinken zur Norm zu konstatieren. Bei offener Bauchhöhle ergaben Versuche an Hunden wechselndes Verhalten. Bei einem Hunde mit auffallend niederem Blutzuckergehalt von $0,02\%$ hatte die Injektion von 25 ccm 10% iger Traubenzuckerlösung einen Anstieg auf $0,09\%$ nach etwa 5 Minuten bei geschlossener Bauchhöhle zur Folge, nach ca. 60 Minuten war der Zuckergehalt wieder auf $0,02\%$ gesunken. Die gleichzeitig mit der Laparotomie erfolgende neuerliche Injektion von 20 ccm Zucker-

lösung führte in den nächsten 70 Minuten zu keiner wesentlichen Änderung des Blutzuckergehaltes. In dem reichlich sezernierten Harn, 225 com, waren 5,95% Traubenzucker gleich 13,4 g enthalten.

Bei einem Hunde mit dem geringen Gehalt von 0,034% Traubenzucker im Blute war nach der Laparotomie reichliche Zuckerausscheidung unter weiterem Absinken des Blutzuckergehaltes erfolgt. Er betrug nach 30 Minuten nur 0,013%. Injektion von 10 g Traubenzucker, in 80 g Wasser gelöst, ließ den Blutzuckergehalt auf 0,08% ansteigen, und nach 1½ Stunden war ein weiterer Anstieg auf 0,176% gefolgt.

Bei einem Hunde mit dem Blutzuckergehalt von 0,123% kam es bei geschlossener Bauchhöhle nach Injektion von 10%iger Traubenzuckerlösung zu einem Anstieg des Blutzuckers auf 0,198%, in den nächsten 40 Minuten sank der Blutzucker auf 0,180%. Die nun ausgeführte Laparotomie unterbrach das Absinken des Blutzuckers. Nach 50 Minuten war er auf 0,216% gestiegen.

Ein Sinken des Blutzuckergehaltes, wie beim normalen Tiere, war auch beim laparotomierten in einem Falle mit auffallend niederem Ausgangswerte von 0,02% zu verzeichnen. Die Laparotomie war hier von keiner Glucosurie gefolgt gewesen und hatte ein weiteres Sinken des Blutzuckers auf 0,01% gebracht. Injektion von 5,0 g Traubenzucker in 10%iger Lösung hatte Anstieg auf 0,063% zur Folge. In den nächsten 20 Minuten sank der Blutzuckergehalt auf 0,034%. Der Harn enthielt höchstens Spuren Zucker. Erst nach Injektion physiologischer Kochsalzlösung kam es zu ausgesprochener Glucosurie.

Bei einem Tiere mit normalem Blutzucker von 0,122% brachte die von keiner Glucosurie gefolgte Laparotomie ein Absinken des Zuckerwertes auf 0,051% (nach 30 Minuten). Nach Einspritzung einer kleinen Zuckermenge (6,0 g) stieg der Blutzucker auf 0,082%, um binnen 40 Minuten auf 0,034% zu sinken.

In zwei Fällen von Urannephritis hatte die nach Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte Zuckerinfusion das eine Mal bei deutlicher Albuminurie starkes Absinken des Blutzuckers, von 0,452% auf 0,260%, das zweite Mal, bei Spuren Eiweiß im Harn, geringgradigeren Abbau des injizierten Zuckers von

0,596% auf 0,524% in 30 Minuten zur Folge. Im ersten Falle waren in dem nach der Eröffnung der Bauchhöhle gelassenen Harn 1,79% Zucker, im zweiten Falle höchstens Spuren enthalten gewesen.

Bei einem Hunde mit Kantharidinnephritis, bei dem die Laparotomie nicht von Glucosurie, wohl aber von Anstieg des Blutzuckers von 0,215% auf 0,372% (20 Minuten p. Laparotomiam) gefolgt war, wurde der injizierte Zucker (50 ccm 10%ige Lösung) ungemein rasch abgebaut. Der auf 0,746% gestiegene Blutzuckergehalt sank nach 45 Minuten auf 0,22%, nach 50 Minuten auf 0,208%.

Die Untersuchung des Harnes vor und nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde bei einer großen Zahl von Hunden, die zwecks Vornahme anderer Operationen laparotomiert worden waren, vorgenommen. Mehrere Tiere wurden ausschließlich zu diesem Behufe laparotomiert. Nach Ausscheidung aller jener Fälle, bei denen die Untersuchung ein in nicht ganz einwandfreier Weise sicheres Resultat ergab, verbleiben 36 Hunde.

In einer Reihe von Fällen enthielt der Harn bereits vor der Eröffnung der Bauchhöhle Zucker in deutlich nachweisbarer Menge: unter 36 Versuchen 10 mal.

Doch konnte in mehreren dieser Fälle ein deutlicher Anstieg nach der Laparotomie konstatiert werden: in einem Falle war die Reaktion nach Morphininjektion sehr schwach, nach Einleitung der Äthernarkose stieg der Gehalt an Zucker an und erreichte nach Eröffnung der Bauchhöhle seine höchste Stufe; in anderen Fällen konnte das deutliche Ansteigen nach der Laparotomie festgestellt werden.

Bei den übrigen Fällen war die Glucosurie nur dort ausgeblieben, wo mehrstündige Anurie sich nach dem Eingriff — Unterbindung der Art. renalis, Ureterunterbindung — eingestellt hatte: in 3 Fällen nach einseitiger Unterbindung der Nierengefäße, in 4 Fällen von Ureterunterbindung. Daß es wirklich diese Anurie ist, die den Nachweis hemmt, beweist ein Fall, wo ein Hund die Unterbindung länger überlebte und am nächsten Tage im Blasenarn 3,5% Zucker hatte. Bei einem Hunde, dessen Ureter rechterseits unterbunden worden war, enthielt der bei der am 5. Tage vorgenommenen Sektion entnommene Harn eine deutliche Zuckermenge.

Die restierenden 19 Hunde zeigten nach der Laparotomie intensive Glucosurie.

Rückenmarksdurchschneidung hatte keine Beeinflussung der Glucosurie bei einem Hunde zur Folge, dessen Harn allerdings bereits vor der Laparotomie deutliche Zuckerreaktion gezeigt hatte.

Bei einem Affen blieb der Harn auch nach der Laparotomie zuckerfrei.

Unter 8 Versuchen an Kaninchen zeigten 5 keine Glucosurie im Harn nach der Laparotomie, bei den 3 übrigen konnte starke Reduktion der Fehlingschen Lösung mit dem stark verdünnten Harn nachgewiesen werden.

Bei zwei Katzen blieb der Harn nach Laparotomie zuckerfrei.

Die mitgeteilten Versuche lehren, daß durch die Eröffnung der Bauchhöhle bei den Versuchstieren — Hunden, Katzen, Kaninchen — eine, wenn auch vorübergehende, Störung des Kohlenhydratstoffwechsels herbeigeführt wird. Bei einer großen Zahl von Fällen, besonders beim Hunde, kommt es zu intensiver Glucosurie, bei anderen Tieren, besonders Katze, Kaninchen, ist die gleichsinnige Stoffwechselstörung durch den Anstieg des Blutzuckerwertes erwiesen.

Die Kenntnis dieser Tatsache ist um so wichtiger, als Nichtberücksichtigung dieser Störung des Kohlenhydratstoffwechsels nach der Laparotomie zu irrigen Deutungen von Versuchsergebnissen führen muß.

Literatur.

- Winkler, F., Centralbl. f. Physiol. 24, Nr. 8.
Graham Lusk, Ergebn. d. Physiol. 12, 336, 1912.
I. Bang, Der Blutzucker. 1912. S. 110.
Weinland, Centralbl. f. Stoffwechselkrankheiten 5, 481.
-

**Synthetische Antigene zur Meiostragminreaktion bei
bösaartigen Geschwülsten.**

IV. Mitteilung.

**Einfache und gemischte Glyceride der Myristil-, Linol-
und Ricinolsäure.**

Von

Guido Izar.

(Aus dem Institut für spezielle Pathologie innerer Krankheiten der
kgl. Universität Catania.)

(Eingegangen am 13. Februar 1914.)

Gegenstand weiterer Untersuchungen über das Verhalten der Fettsäuren gegenüber Normal- und Tumoreris bildeten die einfachen und gemischten Glyceride der Myristil-, Linol- und Ricinolsäure.

Es ist wohl bekannt, daß die in den tierischen Geweben vorhandenen Neutralfette nicht nur einfache, d. h. durch Verbindung eines einzigen Fettsäureradikals mit Glycerin entstandene Glyceride sind, sondern daß auch mehr komplexe Glyceride vorkommen, die durch die Verbindung der Radikale verschiedenartiger Fettsäuren mit Glycerin sich bilden, so das von Blith und Robertson¹⁾ isolierte Oleobutyropalmitin, das aus Rind- und Hammeltalg von Kreis und Hafner²⁾ dargestellte Palmitodistearin, das aus Schweinefett ebenfalls von diesen letzteren Autoren isolierte Daturodistearin, das von Hansen³⁾ aus Hammeltalg und von Klimont⁴⁾ aus Gänse- und Entenfett isolierte Stearodipalmitin, das von Kreis und

¹⁾ Chem. Zeitg. 1889, S. 162.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 36, 2766 bis 2773.

³⁾ Arch. f. Hygiene 42, 1902.

⁴⁾ Monatsh. f. Chem. 1909.

Hafner¹⁾ aus Schweinefett erhaltene Heptadecadistearin, das aus Gänse- und Entenfett von Hansen²⁾ isolierte Oleodipalmitin, das aus Menschenfett von Partheil und Férié³⁾ isolierte Dioleostearin, das aus Hammeltalg von Hansen⁴⁾ isolierte Oleopalmitostearin.

Bei der Darstellung der einfachen Glyceride habe ich für die α -Monoglyceride, $\alpha\alpha$ -Diglyceride und Triglyceride die Methode von Guth⁵⁾ und Kraft⁶⁾, und für die β -Monoglyceride und $\alpha\beta$ -Diglyceride die Technik von Grün und seinen Schülern⁷⁾ benutzt. Die komplexen Glyceride sind von mir nach der gleichfalls von Grün und Mitarbeitern⁷⁾ angegebenen Methode hergestellt worden.

Einfache Glyceride.

α -Monolinolein. 10 g Kaliumlinoleat⁸⁾ werden nach Trocknung im Wasserbade und feiner Pulverisierung in ein zylindrisches Glasgefäß mit konvexem Boden und geschliffenem von zwei eingeschmolzenen Glasröhren durchsetzten Glasstöpsel gebracht. Die zentrale Röhre ist mit geschliffenem Glashahn versehen und reicht bis zum Gefäßboden; die zweite seitliche ragt nicht in das Innere des Gefäßes hinein⁹⁾. Das Gefäß wird ins metallische Wasserbad mit Woodscher Legierung bei 160° gestellt und das Kaliumlinoleat mittels Durchleitung eines trockenen Wasserstoffstromes weiter 1 stündig getrocknet. Darauf werden durch den Rohransatz 3,5 g α -Monochlorhydrin zugesetzt und 12 Stunden lang unter steter Wasserstoffdurchleitung erhitzt. Nach Ab-

¹⁾ l. c.

²⁾ l. c.

³⁾ Arch. f. Pharm. 1908, S. 545.

⁴⁾ Arch. f. Hygiene 42.

⁵⁾ Zeitschr. f. Biol. 26, 78 und Chem. Centralbl. 1, 133, 1903.

⁶⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 36, 4339, 1903.

⁷⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 40, 42, 43. — Weyrauch, Dissertation Zürich 1911. — Grün, Habilitationsschrift. — Skopnik, Dissertation Zürich 1909.

⁸⁾ 56 g Linolsäure in absolutem Alkohol aufgelöst, werden mit einer alkoholischen Lösung von 12 g KOH versetzt, im Wasserbad eingeeengt, 20 ccm gesättigte alkoholische KOH-Lösung zugegossen und zur Trockne eingedampft.

⁹⁾ Der Apparat ist mit der von Straus und Würtz zur bakteriologischen Luftanalyse angegebenen Vorrichtung fast identisch.

kühlung der Masse (die sich in 2 Schichten, einer halbflüssigen und einer krystallinischen von KCl-Krystallen, teilt) folgt die Extraktion mit wasserfreiem Äther bei 30 bis 31°. Die ätherische abfiltrierte Lösung wird nun im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure langsam abgedampft; der Rückstand in absolutem Äthylalkohol gelöst, die alkoholische Lösung während 30 Minuten mit Tierkohle gekocht und durch dichtes Filtrierpapier filtriert. Darauf folgt die Verjagung des Alkohols, bis sich bei starker Abkühlung eine ölige gelbliche, in Äther, Benzol, Chloroform gut, in Methylalkohol, Äthylalkohol, Ligroin, Schwefelkohlenstoff wenig lösliche Substanz abscheidet, die bei -10° nicht fest wird. Die Halogenprobe fällt mit der so gewonnenen Substanz negativ aus; auf Platinblech verbrennt sie ohne Rückstand.

α -Dilinolein. Wird nach der eben geschilderten Technik durch Einwirkung von 10 g Kaliumlinoleat auf 2 g *α -Dichlorhydrin* hergestellt. Das gereinigte Präparat stellt ein dickflüssiges, in Äther, Benzol, Chloroform gut, in Methyl- und Äthylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff wenig lösliches Öl dar.

Trilinolein. Technik wie oben; 10 g Kaliumlinoleat werden mit 1,5 g Trichlorhydrin versetzt. Die so gewonnene gereinigte Substanz ist ein rötlich-gelbes, in Äther, Benzol, Chloroform sehr leicht, in Methyl- und Äthylalkohol, Ligroin, Schwefelkohlenstoff wenig lösliches Öl.

α -Monoricinolein. Herstellungsmethode wie für das *α -Monolinolein*; Einwirkung von 11 g Kaliumricinoleat¹⁾ auf 3,5 g *α -Monochlorhydrin*. Das gereinigte Präparat stellt ein bei $+15^{\circ}$ dickflüssiges gelbliches, in Äther, Benzol und Chloroform sehr leicht, in Methyl- und Äthylalkohol, sowie in Ligroin, Schwefelkohlenstoff wenig lösliches Öl dar.

α -Diricinolein. Herstellungstechnik wie bei *α -Dilinolein*. Einwirkung von 11 g Kaliumricinoleat auf 2 g Dichlorhydrin. Das gereinigte Präparat ist ein bei $+15^{\circ}$ dickflüssiges gelbliches, in Äther, Benzol, Chloroform sehr leicht, in Methyl- und Äthylalkohol, Ligroin, Schwefelkohlenstoff wenig lösliches Öl.

¹⁾ 59,6 g Ricinolsäure, in absolutem Äthylalkohol gelöst, werden 12 g von KOH in Äthylalkohol gelöst, zugesetzt, im Wasserbad eingeengt, dazu noch 20 ccm der gesättigten alkoholischen KOH-Lösung zugesetzt und zur Trockne eingedampft.

Triricinolein. Wird nach der für das Trilinolein angewandten Technik, durch Einwirkung von 11 g Kaliumricinoleat auf 1,5 g Trichlorhydrin, hergestellt. Das gewonnene gereinigte Präparat stellt ein hellgelbes, in Äther, Benzol, Chloroform sehr leicht, in Methyl- und Äthylalkohol, Ligroin, Schwefelkohlenstoff wenig lösliches Öl dar.

α -Monomyristin. Herstellung wie bei α -Monolinolein. 3 g Kaliummyristilat¹⁾ werden mit 1,2 g Monochlorhydrin versetzt. Die gewonnene Substanz stellt nach Rekrystallisierung aus Schwefelkohlenstoff weiße, glänzende, in Äther, Chloroform, Benzol leicht, in Methyl- und Äthylalkohol, Ligroin, Schwefelkohlenstoff schwer lösliche Krystalle dar. Schmelzpunkt 68°.

β -Monomyristin. 5 g β -Myristo- $\alpha\alpha$ -Dichlorhydrin (siehe weiter) mit 9 g fein pulverisierten AgNO_3 werden im Wasserbad mit Woodscher Legierung und unter Durchtritt eines Stromes trockenen Wasserstoffs 12 Stunden lang bei 120 bis 125° erhitzt. Die gewonnene Substanz wird nun mit wasserfreiem Äther warm bis zur Erschöpfung extrahiert und filtriert; dem ätherischen Filtrat werden (behufs Verjagung der Spuren Silbersalz) einige Tropfen alkoholischer HCl-Lösung zugesetzt; zweite Filtration durch dickes Papier. Nach Abdampfung des Äthers wird der Rückstand in Alkohol gelöst, sodann 30 Minuten lang mit Tierkohle gekocht und dann filtriert. Das vom Alkohol durch Abdampfen befreite, aus Schwefelkohlenstoff rekrystallisierte Präparat stellt weiße, glänzende, in Äther, Chloroform und Benzol leicht, in Methyl- und Äthylalkohol, Ligroin, Schwefelkohlenstoff schwer lösliche Krystalle dar. Schmelzpunkt 69°.

$\alpha\beta$ -Dimyristin. 5,3 g $\alpha\beta$ -Dimyristo- α -chlorhydrin (siehe weiter) werden wie oben mit 5 g AgNO_3 versetzt; das gewonnene, aus Alkohol und Schwefelkohlenwasserstoff rekrystallisierte Produkt stellt weiße, glänzende, in Äther, Benzol und Chloroform leicht, in Methyl- und Äthylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff weniger lösliche Krystalle dar. Schmelzpunkt 64°.

$\alpha\alpha$ -Dimyristin. Wird wie das $\alpha\alpha$ -Dilinolein durch Einwirkung von 18 g Kaliummyristilat auf 4 g $\alpha\alpha$ -Dichlorhydrin hergestellt.

¹⁾ 45,6 g Myristilsäure werden in absolutem Äthylalkohol gelöst und dazu 12 g des in Alkohol gelösten KOH zugesetzt; Abdampfung im Wasserbad, Zusatz von 20 ccm gesättigter alkoholischer KOH-Lösung und Eindampfen bis zur Trockne.

Das gewonnene, aus Alkohol und Schwefelkohlenstoff rekrystallisierte Präparat ist weiß, krystallinisch, in Äther, Benzol und Chloroform leicht, in Alkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff wenig löslich. Schmelzpunkt $63,5^{\circ}$.

Trimyristin. Wird wie das Trilinolein durch Einwirkung von Kaliummyristilat auf Trichlorhydrin hergestellt. Außerdem ist von mir angesichts der größeren Ausbeute und des reiner zu gewinnenden Produkts auch die Methode von Weyrauch¹⁾ durchgeführt worden, die dieser Autor zur Herstellung des Tripalmitins vorgeschlagen hat: 6 g Kaliummyristilat werden mit 3,5 g (2,1:1) β -Myristo- α -Dichlorhydrin versetzt (vgl. unten Zwischenverbindungen). Das gewonnene, aus Alkohol und Schwefelkohlenstoff rekrystallisierte Präparat stellt eine weiße, krystallinische, pulverförmige, in Äther, Benzol und Chloroform leicht, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff wenig lösliche Substanz dar. Schmelzpunkt 55° .

Gemischte Glyceride.

Hier möchte ich zunächst die Technik der Herstellung der Zwischenverbindungen vorausschicken:

α -Myristo- α -Chlorhydrin. 26 g Myristilchlorid²⁾ werden im vorher beschriebenen Apparat mit 15 g α -Monochlorhydrin im Wasserbad bei 50° versetzt; durch das Gemisch wird ein trockener Luftstrom kontinuierlich durchgeleitet, der die sich bildende Chlorwasserstoffsäure vertreibt. Nach 5 Stunden ist die Zersetzung vollständig. Die entstandene braune Substanz wird mit Äther extrahiert, die ätherische Lösung mit einer verdünnten Natriumbicarbonatlösung, bis die Myristilsäure aus dem Waschwasser verschwindet, versetzt. Die so gereinigte ätherische Lösung wird dann mit destilliertem H_2O gewaschen, durch Zusatz von fein pulverisiertem Kalium sulphur. siccum getrocknet, darauf durch dickes Papier filtriert und bei Zimmertemperatur der Äther verjagt. Das weitere Produkt ist ein dünnflüssiges, gelbliches, in Äther, Benzol und Ligroin sehr leicht, in Methyl- und Äthylalkohol, Chloroform und Schwefelkohlenstoff schwer lösliches Öl.

¹⁾ l. c.

²⁾ Diese Zeitschr. 40, 402.

α -Linoleo- α -Chlorhydrin. Herstellung wie bei $\alpha\alpha$ -Dilinolein, indem 10 g Kaliumlioleat mit 4 g $\alpha\alpha$ -Dichlorhydrin versetzt werden. Das gereinigte Produkt stellt ein dickflüssiges, rötlich-gelbes, in Äther, Benzol, Chloroform leicht, in Methyl- und Äthylalkohol, sowie in Ligroin und Schwefelkohlenstoff wenig lösliches Öl dar.

β -Myristo- $\alpha\alpha$ -Dichlorhydrin. Wird wie das α -Myristo- α -Chlorhydrin durch Versetzung von 20 g Myristilchlorids mit 11,5 g $\alpha\alpha$ -Dichlorhydrin hergestellt. Das aus Alkohol rekrySTALLisierte Produkt bildet feine, weiße, durchscheinende, in Äther, Benzol, Ligroin sehr gut, in Äthyl- und Methylalkohol, Chloroform und Schwefelkohlenstoff schlecht lösliche Krystalle. Schmelzpunkt 18°.

α -Ricinoleo- α -Chlorhydrin. Herstellung wie für das α -Linoleo- α -Chlorhydrin, d. h. 11 g Kaliumricinoleat werden mit 4 g $\alpha\alpha$ -Dichlorhydrin versetzt. Das gereinigte Präparat ist ein dünnflüssiges, gelbes, in Äther, Benzol, Chloroform gut, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff wenig lösliches Öl.

$\alpha\beta$ -Dimyristo- α -Chlorhydrin. Herstellung wie für $\alpha\alpha$ -Dimyristin, indem 5 g Kaliummyristilat mit 6,8 g β -Myristo- $\alpha\alpha$ -Dichlorhydrin versetzt werden. Das so gewonnene, gereinigte Produkt besteht aus feinen, weißen, in Äther, Ligroin, Benzol sehr leicht, in Äthyl- und Methylalkohol, sowie in Chloroform und Schwefelkohlenstoff weniger löslichen Krystallen. Schmelzpunkt 30°.

β -Myristo- α -Chlorhydrin- α -Linolein. Herstellung wie oben; durch Versetzung von 3,2 g Kaliumlinoleat mit 3,4 g β -Myristo- $\alpha\alpha$ -Dichlorhydrin hergestellt. Das gereinigte Produkt stellt eine amorphe, gelbliche, bei + 20° schmelzbare, in Äther, Ligroin, Benzol leicht, in Schwefelkohlenstoff, Äthyl- und Methylalkohol und Chloroform wenig lösliche Masse dar.

β -Myristo- α -Chlorhydrin- α -Ricinolein. Dieselbe Technik: 3,4 g Kaliumricinoleat werden mit 3,4 g β -Myristo- $\alpha\alpha$ -Dichlorhydrin versetzt. Das gereinigte Produkt bildet eine teigartige, gelbliche, bei + 15° schmelzbare, in Äther, Ligroin und Benzol leicht, in Äthyl- und Methylalkohol, sowie in Chloroform und Schwefelkohlenstoff schwer lösliche Masse.

Gemischte Glyceride.

β -Myristo- α -Linolein. Herstellung wie beim β -Monomyristin, indem 1 g β -Myristo- α -Chlorhydrin- α -Linolein mit 1 g AgNO_3 versetzt wird. Das gereinigte Produkt besteht aus einer pulverförmigen, bei 38° schmelzbaren, in Äther, Benzol und Chloroform leicht, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff wenig löslichen Substanz.

β -Myristo- α -Ricinolein. Wie das letzte Präparat hergestellt, indem 1 g β -Myristo- α -Chlorhydrin- α -Ricinolein mit 1 g AgNO_3 versetzt wird. Das gereinigte Produkt bildet eine amorphe, gelbliche, bei $+33^\circ$ schmelzbare, in Äther, Benzol, Chloroform leicht, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin, Schwefelkohlenstoff schwer lösliche Substanz.

α -Myristo- α -Linolein. Wird wie α -Monolinolein, nämlich durch Versetzung von 3,2 g α -Myristo- α -Chlorhydrin mit 3,5 g Kaliumlinoleat hergestellt. Die Reinsubstanz stellt eine amorphe, teigartige, hellgelbe, bei $+15^\circ$ schmelzbare, in Äther, Benzol, Chloroform leicht, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff wenig lösliche Masse dar.

α -Myristo- α -Ricinolein. Wird ebenso mit 3,2 g α -Myristo- α -Chlorhydrin und 4 g Kaliumricinoleat hergestellt. Das Reinprodukt ist eine bei $+15^\circ$ teigartige, gelbliche, in Äther, Benzol und Chloroform leicht, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff nicht gut lösliche Masse.

α -Linoleo- α -Ricinolein. Wie oben mit 4 g α -Linoleo- α -Chlorhydrin und 3,5 g Kaliumricinoleat hergestellt. Das Reinprodukt stellt ein dickflüssiges, rötlich-gelbes, in Äther, Benzol und Chloroform gut, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin, Schwefelkohlenstoff nicht leicht lösliches Öl dar.

$\alpha\beta$ -Dimyristo- α -Ricinolein. In gleicher Weise aus 2,7 g $\alpha\beta$ -Dimyristo- α -Chlorhydrin und 1,8 g Kaliumricinoleat hergestellt. Die Reinsubstanz besteht aus einer amorphen, gelblichen, bei $+15^\circ$ teigartigen, in Äther, Benzol und Chloroform leicht, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff nicht gut löslichen Masse.

$\alpha\beta$ -Dimyristo- α -Linolein. In gleicher Weise aus 2,7 g $\alpha\beta$ -Dimyristo- α -Chlorhydrin und 1,6 g Kaliumlinoleat hergestellt. Die Reinsubstanz ist amorph, weißlich, schmilzt bei 42° , in

Äther, Benzol und Chloroform leicht, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff nicht gut löslich.

β -Myristo- α -Dilinolein. Nach der gleichen Methode aus 3,4 g β -Myristo- α -Dichlorhydrin und 6,5 g Kaliumlinoleat hergestellt. Das Reinprodukt stellt eine amorphe, gelbliche, bei $+15^{\circ}$ teigartige, in Äther, Benzol und Chloroform gut, in Äthyl- und Methylalkohol, sowie in Ligroin und Schwefelkohlenstoff wenig lösliche Masse dar.

β -Myristo- α -Diricinolein. In gleicher Weise aus 3,4 g β -Myristo- α -Dichlorhydrin und 7,9 g Kaliumricinoleat hergestellt. Die Reinsubstanz besteht aus einer gelblichen, amorphen, bei 0° festen Masse, die sich bei $+15^{\circ}$ in ein dickflüssiges, in Äther, Benzol und Chloroform leicht, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff schwer lösliches Öl umwandelt.

β -Myristo- α -Linoleo- α -Ricinolein. Wird in gleicher Weise durch Versetzung von 6 g β -Myristo- α -Ricinoleo- α -Chlorhydrin mit 3,5 g Kaliumlinoleat hergestellt. Das Reinprodukt stellt ein dickflüssiges, gelbliches, in Äther, Benzol und Chloroform gut, in Äthyl- und Methylalkohol, Ligroin und Schwefelkohlenstoff wenig lösliches Öl dar.

Von jedem einzelnen der im Vorliegenden angegebenen Glyceride habe ich bei $+15^{\circ}$ eine methylalkoholisch gesättigte Lösung bereitet; mit diesen Stammlösungen sind dann jedesmal die verschiedenen Verdünnungen hergestellt worden.

Die Versuche mit Normal- und Tumorerum erfolgten folgendermaßen: Mittels der Capillartropfpipette¹⁾ wird 0,01 ccm der methylalkoholischen Glyceridlösung zu 1 ccm Serum zugesetzt, sanft geschüttelt und auf einmal 9 ccm 0,85%iger NaCl-Lösung zugegossen. Zur Kontrolle wurden zu 1 ccm Serum allein 9 ccm der NaCl-Lösung zugesetzt. Sämtliche Proben wurden auf 1 Stunde lang ins Wasserbad bei 50° gebracht

¹⁾ C. Gerhardt-Bonn, Capillartropfpipette nach Izar.

und dann nach spontaner Abkühlung bei Zimmertemperatur stalagmometrisch geprüft (J. Traubisches Stalagmometer zu 56 Tropfen).

Jede der zu untersuchenden Glyceridstammlösungen war vor den eigentlichen Versuchen mit frischem Nichttumor-Serum titriert und auf Grund der Titrierung in solcher Verdünnung herangezogen, daß der stalagmometrische Ausschlag mit Nichttumor-Seris 1 Tropfen nicht überstieg.

Zum Vergleich der Aktivität der verschiedenen Verbindungen wurde jedesmal mit denselben Seris eine Kontrollprobe ausgeführt mit titrierten, alkoholischen Myristilsäure- resp. Linolsäure- und Ricinolsäurestammlösungen (Schuchardt) oder Gemischen der beiden letzten.

Tabelle I.

1 cem Exsudat + 0,01 cem methyl- alkoholische Lösung von	Tuberkulöses Pleura- exsudat	Tumor- exsudat
α -Monomyristin	57,00	55,10
β -Monomyristin	56,14	55,7
$\alpha\alpha$ -Dimyristin	56,16	56,7
$\alpha\beta$ -Dimyristin	56,16	55,15
Trimyristin	56,16	56,2
α -Monolinolein	56,15	58,15
$\alpha\alpha$ -Dilinolein	56,18	58,18
Trilinolein	56,14	58,11
α -Monoricinolein	56,16	58,18
$\alpha\alpha$ -Diricinolein	57,5	58,7
Triricinolein	57,1	58,0
α -Myristo- α -Linolein	57,1	59,2
β -Myristo- α -Linolein	56,15	55,15
α -Myristo- α -Ricinolein	57,00	61,10
β -Myristo- α -Ricinolein	56,12	55,10
α -Linoleo- α -Ricinolein	56,15	61,00
$\alpha\beta$ -Myristo- α -Linolein	56,13	57,00
$\alpha\beta$ -Myristo- α -Ricinolein	56,12	57,2
β -Myristo- $\alpha\alpha$ -Linolein	57,00	59,6
β -Myristo- $\alpha\alpha$ -Diricinolein	57,2	61,10
β -Myristo- α -Linoleo- α -Ricinolein	57,0	60,00
Myristilsäure	57,0	58,0
Linolsäure	57,2	62,5
Ricinolsäure	57,0	61,2
Myristilsäure + Linolsäure	56,15	60,17
Myristilsäure + Ricinolsäure	56,18	61,18
Linolsäure + Ricinolsäure	57,2	65,15
Myristilsäure + Linolsäure + Ricinolsäure	56,17	62,3
Kontrolle ohne Zusatz	56,10	55,0

Aus Tabelle I, die zusammenfassend die Resultate dieser Untersuchungen enthält, ergibt sich, daß die Mehrzahl der einfachen Glyceride der Myristil-, Linol- und Ricinolsäure mit Tumorseris positiv reagieren. Die Größe der Ausschläge bleibt hinter den von den entsprechenden Fettsäuren ergebenen zurück; einige einfache Glyceride erwiesen sich hingegen vollständig unwirksam. Unter den gemischten Glyceriden, die sich insgesamt als wirksam herausstellten, erwiesen sich die α -Diglyceride aktiver als die $\alpha\beta$ -Diglyceride: von den Triglyceriden zeigten sich diejenigen wirksamer, in denen die Linol- und Ricinolsäure beide α -Stellungen einnehmen.

Über die Schardingersche Formaldehyd-Methylenblau-Reaktion¹⁾ und einige andere Fermentreaktionen bei Ziegenmilch.

Von
W. Wedemann.

(Aus der Veterinärabteilung des Kaiserlichen Gesundheitsamts, Berlin.)

(Eingegangen am 20. Februar 1914.)

In der neuesten Auflage von C. Oppenheimer: „Die Fermente und ihre Wirkungen“, Leipzig 1913²⁾ findet sich bei der Besprechung der Schardingerschen Formaldehyd-Methylenblaureaktion die Angabe, daß Ziegenmilch die Reaktion, d. h. die Entfärbung der Formaldehyd-Methylenblaulösung³⁾ bei 70° nicht geben soll unter Bezugnahme auf eine Mitteilung von A. Harden und A. Lane-Claypon⁴⁾ über das Vorkommen von Fermenten in steriler Kuh- und Ziegenmilch. Es dürften deshalb Beobachtungen über die F.-M.-Reaktion, die gelegentlich der Untersuchung von Ziegenmilch gemacht wurden, von Interesse sein.

Die Schardingersche F.-M.-Reaktion beruht nach Oppenheimer auf der Fähigkeit eines in unveränderter Milch enthaltenen Fermentes, das an Reduktionsprozessen beteiligt ist und von den „kompletten“ Reduktasen sich dadurch unterscheidet, daß es, ohne selbst reduzierend zu wirken, die redu-

¹⁾ Schardinger, Über das Verhalten der Kuhmilch gegen Methylenblau und seine Verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 1902, 1113.

²⁾ C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. 4. Aufl. S. 844. Leipzig 1913.

³⁾ Der Kürze wegen als F.-M. bezeichnet.

⁴⁾ A. Harden and J. E. Lane-Claypon, Occurence of ferments in the sterile milk collected by milking tules from cows and goats. Journ. of Hyg. 12, 144, 1912.

zierende Wirkung der Aldehyde, hier des Formaldehyds, beschleunigt. Die Existenz dieses von Bakterien unabhängigen Fermentes ist mehrfach bestätigt worden. Nach der ebenda angegebenen Nomenklatur ist das Schardingersche Ferment eine Oxydoreduktase (Hydroxydase). Dieser Bezeichnung entsprechen die in der Literatur sich findenden Aldehydkatalase, F.-M.-Reduktase, Schardinger-Enzym (-Ferment), Perhydridase [(Bach¹⁾]. Weitere Einzelheiten sowie ausführliche Literaturangaben finden sich bei Oppenheimer.

In der vorliegenden Mitteilung soll auf die Theorien über die Wirkungsweise dieses Fermentes nicht eingegangen werden. Nicht unerwähnt sei, daß bei der Schardingerschen Reaktion die Milch durch anorganische Salze und Katalysatoren, wie von Bredig und Sommer²⁾ sowie von Bach u. a. nachgewiesen worden ist, ersetzt werden kann.

Zunächst seien die in der hier zugänglichen Literatur vorhandenen wenigen Angaben über das Verhalten von Ziegenmilch gegen die F.-M.-Reaktion und den Gehalt an anderen Fermenten angeführt. H. Smidt³⁾ beobachtete gelegentlich der Untersuchung des Reduktionsvermögens der Milch bei verschiedenen Proben frischer roher Ziegenmilch ein Ausbleiben der F.-M.-Reaktion. Der Rahm der Ziegenmilch entfärbte das F.-M.-Reagens nur schwach. Die Ziegenmilch enthält außerdem geringe Mengen Katalase, dagegen große Mengen Oxydase.

Nach Chr. Barthel⁴⁾ besitzt Ziegenmilch geringe oder keine Reduktionskraft, die Angabe scheint von Smidt übernommen zu sein; denn eigene Versuche werden nicht angegeben.

Sassenhagen⁵⁾ konnte bei roher Ziegenmilch, die von drei

¹⁾ Zit. nach Oppenheimer.

²⁾ G. Bredig und F. Sommer, Anorganische Fermente. V. Die Schardingersche Reaktion und ähnliche enzymartige Katalysen. Zeitschr. f. physikal. Chem. 70, 34, 1909.

³⁾ H. Smidt, Über die Fähigkeit der Milch, Methyleneblau zu reduzieren. Hyg. Rundschau 1904, Heft 14, S. 1137.

⁴⁾ Chr. Barthel, Verwendbarkeit der Reduktaseprobe zur Beurteilung der hygienischen Beschaffenheit der Milch. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 15, 385, 1908.

⁵⁾ M. Sassenhagen, Über die biologischen Eigenschaften der Colostral- und Mastitismilch. Inaug.-Diss. Stuttgart, Sonderabdruck aus Arch. f. Kinderheilkunde 33, 281 bis 332, 1910.

verschiedenen Ziegen stammte, die F.-M.-Reaktion nicht erhalten, dagegen gelang es ihm, im Rahm der Ziegenmilch einen Gehalt an Reduktase nachzuweisen.

A. Harden und J. E. Lane-Claypon¹⁾ beobachteten bei ihren Untersuchungen über den Fermentgehalt der sterilen Milch bei Ziegenmilch keine Entfärbung des F.-M.-Reagenzes, nur in einem Falle wurde F.-M. entfärbt von einer Milch, die aber auch mit Methylenblau allein reagierte. Diesen einen Fall fassen sie als eine Reduktionswirkung auf, die mit der F.-M.-Reaktion nichts zu tun hat. Sie kommen deshalb zu dem Schluß, daß sterile Ziegenmilch Aldehydreduktase nicht enthält.

Koning²⁾ neigt der Ansicht zu, daß Ziegenmilch Spuren von Aldehydkatalase enthält.

Grimmer³⁾ kommt in seiner Arbeit „Beiträge zur Kenntnis der Herkunft einiger Milohenzyme“ bezüglich der Reduktase und Aldehydkatalase zu dem Ergebnis, daß diese als originäre Enzyme in den milchenden Drüsen der Ziege sicher nicht enthalten sind.

Im Anschluß hieran sei noch die Arbeit von Brüning⁴⁾ „Über das Verhalten des Schwefels in Milch (und Milchpräparaten) sowie zur Schleimhaut des Magendarmkanals“ erwähnt. Er untersuchte, ob die Milch selbst oder ihr Keimgehalt die Schwefelwasserstoffbildung aus zugesetztem Schwefel veranlaßt, und stellte fest, daß frische, möglichst steril entnommene und frisch untersuchte Ziegenmilch aus Schwefel nicht Schwefelwasserstoff zu bilden vermag.

Spindler⁵⁾ berichtet über den Katalasegehalt von 6 Proben Ziegenmilch. 4 Proben zeigten eine niedrige Katalasezahl (0,5 bis 1,0 ccm O), eine andere, von einer noch nicht trächtig gewesenen Ziege 3,0 ccm O. Die Milch einer Ziege, die vor

¹⁾ l. o.

²⁾ J. C. Koning, Biologische und biochemische Studien über Milch. Heft 1 1907; Heft 2 1908. Leipzig, Heinsius Nachf.

³⁾ W. Grimmer, Beiträge zur Kenntnis der Fermente der Milchdrüse und Milch. Diese Zeitschr. 53, 429, 1913.

⁴⁾ H. Brüning, Über das Verhalten des Schwefels zu Milch (und Milchpräparaten) sowie zur Schleimhaut des Magendarmkanals. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 3, 157, 1906.

⁵⁾ F. Spindler, Beiträge zur Kenntnis der Milchkatalase. Diese Zeitschr. 30, 384, 1911.

mehreren Monaten ein Lamm geworfen hatte, bildete 9,5 ccm O, der sich aber nach einiger Zeit um die Hälfte verminderte. Das Tier war gesund. Spindler rechnet mit der Möglichkeit, daß die Milch einen erheblichen Gehalt an Colostralkörperchen während der Dauer der Lactation hatte, was bei Ziegen vorkommen soll.

Faßt man das Ergebnis über die Untersuchungen des Fermentgehaltes der Ziegenmilch zusammen, so zeigt sich, daß Smidt, Harden, Lane-Claypon, Barthel (und Grimmer) auf dem Standpunkt stehen, daß Ziegenmilch das Schardingersche Ferment nicht enthält, dagegen will Sassenhagen es in dem Rahm der Ziegenmilch gefunden haben, und Koning ist der Ansicht, daß es in Spuren in der Ziegenmilch enthalten ist.

Außer diesen Angaben finden sich noch Notizen über den Katalasegehalt von Smidt, Grimmer und Spindler, den Oxydasegehalt von Smidt und das Reduktionsvermögen der Ziegenmilch von Brüning. Im übrigen scheinen die biologischen Eigenschaften der Ziegenmilch das Interesse noch nicht beansprucht zu haben. In der letzten Zeit jedoch wird erneut von verschiedenen Seiten darauf aufmerksam gemacht, daß die Ziegenmilch wegen ihrer Zusammensetzung und infolge ihrer leichten Verdaulichkeit wohl geeignet ist, die menschliche Muttermilch bei der Säuglingsernährung zu ersetzen.

Das Kaiserin-Augusta-Viktoria-Haus in Berlin zur Bekämpfung der Säuglingsterblichkeit im Deutschen Reich¹⁾ hat sich auch aus diesem Grunde entschlossen, Untersuchungen darüber anzustellen, inwieweit Ziegenmilch für künstlich genährte Säuglinge Anwendung finden kann. In Deutschland allein werden jetzt schon 60 Millionen Liter Ziegenmilch jährlich ermolken, die einen Wert von ungefähr 9 Millionen Mark darstellen (Kuhmilch zur selben Zeit ungefähr 19 Milliarden Liter).

Es ist also zu erwarten, daß der Verbrauch an Ziegenmilch in Zukunft noch steigen wird und somit auch der Kenntnis ihrer Fermente und Fermentreaktionen mehr Aufmerksamkeit zugewendet werden wird. Es ist deshalb außer der Schardingerschen Reaktion die Untersuchung auch noch auf verschiedene andere biologische Eigenschaften der Ziegen-

¹⁾ Die volkswirtschaftliche Bedeutung der Ziegenzucht. Milchwirtschaftl. Centralbl. 1913, Jg. 42, S. 506.

Tabelle I.

Ziege Nr.	1 Datum der Untersuchung	2 Art der Milch	3 Aussehen der Milch	4 Reaktion der Milch gegen Lackmus	5 Rothendrüse Probe	6 Storchsche Probe	7 Benzidin-Probe	8 Katalase ¹⁾	9 Verhalten gegen Methylblau bei 45°	10 Verhalten gegen Scharfinglers F.-M. bei 45 bis 50° und 70°	Verhalten roher Kuhmilch gegen			Verhalten gekochter Kuh- und Ziegenmilch gegen		
											5-7	10	9	5-7	10	9
XIII.	23. VII.	Morgengemelk	normal	amphoter	+	+	+	0,6	binnen 2 Std. nicht entfärbt	binnen 2 Std. nicht entfärbt	+	+	+	+	+	+
	28.	desgl. vom 26. VII.	"	"	+	+	+	0,6	"	"	+	+	+	+	+	+
	28.	Abd.-u. Morgengemelk	"	"	+	+	+	0,4	"	"	+	+	+	+	+	+
	31.	Morgengemelk	"	"	+	+	+	0,5	"	"	+	+	+	+	+	+
XV.	6. VIII.	"	"	"	+	+	+	1,0	"	"	+	+	+	+	+	+
	8.	"	"	"	+	+	+	"	"	"	+	+	+	+	+	+
	24. IX.	Abd.-u. Morgengemelk	"	"	+	+	+	"	"	"	+	+	+	+	+	+
	7. X.	Morgengemelk	"	"	+	+	+	"	"	"	+	+	+	+	+	+
XVI.	9. X.	Milch vom 7. X.	"	etw. sauer	+	+	+	"	"	"	+	+	+	+	+	+
	24. IX.	Morgengemelk	"	"	+	+	+	"	"	"	+	+	+	+	+	+
	8. X.	Anfangsgemelk	"	amphoter	+	+	+	"	"	"	+	+	+	+	+	+
	8. X.	Endgemelk	"	"	+	+	+	"	"	"	+	+	+	+	+	+
I.	31. VII.	Abd.-u. Morgengemelk	"	"	+	+	+	0,7	"	"	+	+	+	+	+	+
	6. VIII.	"	"	"	+	+	+	0,8	"	"	+	+	+	+	+	+
	8.	Morgengemelk	"	"	+	+	+	0,6	"	"	+	+	+	+	+	+
	18.	"	"	"	+	+	+	1,5	"	"	+	+	+	+	+	+
9. X.	4. IX.	Abd.-u. Morgengemelk	"	"	+	+	+	1,0	"	"	+	+	+	+	+	+
	23.	Milch vom 23. IX.	"	"	+	+	+	"	"	"	+	+	+	+	+	+
	24.	Morgengemelk	"	"	+	+	+	"	"	"	+	+	+	+	+	+
	9. X.	Milch vom 9. X.	"	"	+	+	+	"	"	"	+	+	+	+	+	+

+ bedeutet: reagiert normal.

- bedeutet: reagiert nicht.

¹⁾ Nach Lobak.

milch, die auch zur hygienischen Prüfung herangezogen werden können, ausgedehnt worden.

Die Reagenzien wurden in bekannter Weise hergestellt und der Nachweis der Fermente in der bei der Kuhmilch üblichen Weise geführt. Eine zusammenfassende Literaturangabe hierüber findet sich bei Splittgerber¹⁾ und bei Bauer²⁾.

Die in der Tabelle I aufgezeichneten Proben Ziegenmilch stammten von mit Abortusbacillen infizierten Ziegen. Einen Einfluß auf das Befinden der Ziegen oder die Milchmenge hatte diese Infektion nicht.

Ziege XIII, mit Abortusbacillen infiziert, scheidet während der Dauer der Untersuchung mit der Milch Abortusbacillen aus. Die Untersuchung der Milch begann 42 Tage nach der Geburt des Lammes, das während der Dauer des Versuches gesäugt wurde und erstreckte sich über 2 Monate. Zur Entnahme der Milch wurde das Lamm abends von der Mutter entfernt und diese am darauffolgenden Tage ohne besondere Vorsichtsmaßregeln gemolken. An den Tagen, an denen die Milch nicht entnommen wurde, sog das Lamm. Die Untersuchung der Milch geschah ungefähr 3 Stunden nach dem Melken. Die Milch sah in jedem Falle normal aus und unterschied sich nicht von normaler Milch. Die Untersuchung wurde für den speziellen Zweck sobald vorgenommen, um die Wirkung der mit der Milch ausgeschiedenen Abortusbacillen möglichst unabhängig von anderen etwa beim Melken hineingeratenen Bakterien zu prüfen. Abortusbacillen wachsen in Milch langsam und rufen makroskopisch nicht bemerkbare Veränderungen hervor³⁾. Ziege XV, die am gleichen Tage wie XIII gelammt hatte, schied ebenfalls Abortusbacillen mit der Milch aus und säugte das Lamm. Ziege XVI hatte einen Monat früher gelammt und schied gleichfalls Abortusbacillen aus. Das Lamm wurde nicht gesäugt, es war am Tage der Geburt gestorben.

¹⁾ A. Splittgerber, Über den gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse von den Peroxydasen, Katalasen und Reduktasen der Milch. Pharm. Centralhalle 1913, Jg. 53, S. 1289 bis 1296; 1324 bis 1328; 1361 bis 1368; 1390 bis 1394; 1421 bis 1425; 1443 bis 1450.

²⁾ J. Bauer, Die Methodik der biologischen Milchuntersuchung. Stuttgart 1913.

³⁾ Zwick und Zeller, Über den infektiösen Abortus des Rindes. I. Teil. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt Berlin 43, 1, 1913.

Die Ziege wurde seitdem regelmäßig gemolken. Außerdem wurde die Milch der gesunden Ziege I, die ca. 14 Tage später als Ziege XIII gelammt hatte, aber das Lamm nicht säugte, sondern täglich regelmäßig gemolken wurde, untersucht. Die Ziegen bekamen teils Trockenfutter, teils Grünfutter, befanden sich in sauberen Ställen oder weideten tagsüber im Freien. Als Kontrolle diente frische rohe Kuhmilch, die zumeist 20 Stunden zuvor ermolken war.

Die Beobachtungen über das Schardinger-Enzym wurden bei 45 bis 50° und 70° angestellt. Die Röhren standen in einem großen ca. 5 l fassenden Glasgefäß, so daß sie ohne Entfernung daraus betrachtet werden konnten.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die untersuchten Milchproben der kranken Ziegen XIII, XV, XVI, sowie der gesunden Ziege I sich gegen das Rothenfußersche, Storchsche Reagens, die Benzidinprobe und das Schardingersche F.-M.-Reagens vollkommen gleich verhalten und daß der Katalasegehalt ein fast gleichmäßig geringer ist (bei normaler Kuhmilch bis 2,5, pathologischer 4,0 und höhere Zahlen). Die drei zuerst genannten Proben traten in jedem Falle mit der rohen Ziegenmilch prompt ein. Proben gekochter Ziegenmilch und Kuhmilch färbten sich nicht, während die rohe Kuhmilch positiv reagierte. Die Schardingersche F.-M.-Probe blieb dagegen in jedem Falle, sowohl bei einer Temperatur bei 45 bis 50° als 70° aus. Die Kontrollen, rohe Kuhmilch, reagierten in 4 bis 5 Minuten positiv, die gekochte Kuh- und Ziegenmilch entfärbten F.-M. nicht.

Eine Entfärbung von Methylenblau ohne Formaldehyd war bei den einzelnen Proben in 2 bis 3 Stunden bei 37° nicht zu beobachten, was ja auch zu erwarten war, da die Milch wenig gewöhnliche Milchbakterien enthielt und in frischem Zustand untersucht wurde. Die mit der Milch ausgeschiedenen Abortusbacillen wirkten also auf Methylenblau während der Beobachtungsdauer nicht reduzierend.

Aus dem gleichartigem Ausfall der genannten biologischen Reaktionen geht also hervor, daß eine Verschiedenheit und eine Erkennungsmöglichkeit der Milch abortuskranker von der gesunder Ziegen, oder solcher, die ein Lamm säugten, und solcher, die nicht säugten, nicht besteht.

Die in der Literatur gemachten Angaben über das Ver-

halten der Ziegenmilch gegen die Schardingersche F.-M.-Probe konnte also bestätigt werden. Da die an Ziegenmilch erhobenen Befunde sich aber nur auf wenige (l. c.) Tiere beziehen, wurde die Milch möglichst vieler Ziegen verschiedener Herkunft und verschiedener Lactationsperioden von mir untersucht.

32 verschiedene Proben von 12 gesunden Ziegen gelangten zur Untersuchung, und zwar unter Berücksichtigung des Gehaltes an Katalase, Peroxydase, der Fähigkeit, Methylenblau zu oxydieren, der Bestimmung des Säuregrades, des spezifischen Gewichts, des Fettgehalts usw. der untersuchten Proben.

Die Proben wurden teils abends, teils morgens ermolken, teils waren sie eine Mischung beider Gemelke; das Alter der untersuchten Proben schwankte, vom Zeitpunkte des Melkens an gerechnet, zwischen wenigen Stunden und mehreren Tagen. Die Milch wurde, wenn sich die Untersuchung auf mehrere Tage erstreckte, bei niedriger Temperatur gehalten (Eisschrank).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle niedergelegt.

Die 32 untersuchten Milchproben wurden in rohem Zustande nach verschieden langer Zeit geprüft, alle Milchproben gaben prompt die Storchsche, die Benzidin- und die Rothensfußersche Probe, dagegen blieb, mit Ausnahme von einer Probe einer Ziege (eine gleich alte Probe derselben Ziege, 7 Tage später ermolken, vermochte F.-M. nicht zu entfärben), die F.-M.-Reaktion aus, d. h. es trat bis nach 3 bis 4 Stunden bei 45 bis 50° und 70° Wasserbadtemperatur Entfärbung nicht auf. Die Tauglichkeit der Reagenzien wurde an jedem Versuchstage an frischer, roher und gekochter Kuhmilch geprüft. Da sich bei den Kontrollversuchen Abweichungen von der Norm nicht ergaben, sind die Befunde nicht mit in die Tabelle aufgenommen. Aus der Tabelle geht hervor, daß die untersuchten Proben roher, frischer, wenige Stunden bis 3 Tage alter Ziegenmilch, Misch-, Anfangs- und Endmilch, der Milch von Ziegen, die ein Lamm säugten, und solcher, die regelmäßig täglich gemolken wurden, die Peroxydasereaktionen prompt gaben, dagegen die F.-M.-Reaktion nicht. Methylenblau ohne Formaldehyd wurde binnen 3 bis 4 Stunden nicht entfärbt. Die Entfärbung war zumeist nach 6 bis 7 Stunden noch nicht eingetreten. Der Katalasegehalt war ein geringerer als bei Kuhmilch, was auch schon von H. Smidt und teilweise von Spindler an einigen Ziegen-

Tabelle

Bezeichnung der Ziege	Alter der Ziege Jahre	Datum des Lammens	Ob Lamm gesäugt?	Menge der täglich gelieferten Milch	Aussehen der Milch	Alter d. z. Unters. gelangten Milch Std.	Fettgehalt	Reaktion und Säuregrad nach Soxhlet	Spez. Gewicht
1. „Grote“ 30. IX.	2		nein	ca. 1 l	normal	3—4	3,3	amphoter 7,6	1,0310
a) „ „ 30. IX.					„	3—4	—	—	—
b) „ „ 4. X.					„	ca. 2	5,6	amphoter	1,0300
c) „ „ 9. X.					„	„ 3	—	„	—
d) „ „ 10. X.					„	„ 24	—	„	—
e) „ „ 11. X.					„	„ 48	—	„	—
2. „Erdmann“ 30. IX.	3 1/2	März	„	„ 2 l	„	„ 20	4,7	schw.sauer 12,3	1,0309
a) „ „ 6. X.					„	„ 20	4,0	amphoter 10,2	1,0320
b) „ „ 7. X.					„	„ 48	—	—	—
c) „ „ 8. X.					„	„ 72	—	—	—
3. „Steinke“ 29. IX.	3	April	„	„ 4 l	„	„ 20	3,6	amphoter 9,5	1,0308
a) „ „ 6. X.					„	„ 20	5,4	amphoter 10,0	1,0285
b) „ „ 7. X.					„	„ 48	—	—	—
c) „ „ 8. X.					„	„ 72	—	—	—
4. „Richter“ 1. X.	2	Mitte März	„	„ 1 l	„	ca. 3—4	3,3	schw.sauer 9,6	1,0301
5. Junge Ziege 2. X.		Mitte Mai	„	ca. 1 1/2 l	„	ca. 24	4,0	amphoter 7,75	1,0307
6. Alte „ 2. X.	5	April	„	ca. 2 l	„		3,8	8,0	1,0311
7. „328“ 4. X.	5—6	Mitte Juni	„	ca. 600 ccm	„	Abd.-Morgen ca. 4—20	4,3	amphoter 7,6	1,0302
a) „ „ 7. X.					„	ca. 72	—	—	—
b) „ „ 8. X.					„	„ 20	—	—	—
8. „Reiche“ 6. X.	4	März	„	ca. 3 l	„	„ 20	2,4	amphoter 6,75	—
a) „ „ 7. X.					„	„ 48	—	—	—
b) „ „ 8. X.					„	„ 72	—	—	—
9. XVI 8. X.	2	Ende Mai	„		„	ca. 3—4	3,35	amphoter	—
a) „ „ 8. X.					„		4,1	—	—
b) „ „ 10. X.					„	ca. 72	—	—	—
c) „ „ 10. X.					„	„ 72	—	—	—
10. XIV 8. X.	5	Ende Mai	„		„	ca. 3—4	—	—	—
a) „ „ 10. X.					„	ca. 48	—	—	—
11. XVII 9. X.	4—5	Anfg. Juli	„	500 ccm	„	ca. 3—20	4,3	amphoter	1,0292
12. XVIII 10. X.	4—5	desgl.	„	500 ccm	„	ca. 48	—	„	1,0305
					„	ca. 3—20	6,0	„	—

II.

Storchsche Probe	Benzidin-Probe	Rothenfärbung-Probe	Schardingersche Formaldehyd-methylenblau-Probe	Schardingersche Methylenblau-Probe	Menge d. geb. Sauerstoffs ccm	Bemerkungen
+	+	+	Binnen 4 Std. nicht entfärbt.	Nach 2 Std. unverändert.	1,0	Anfangsgemerk (ca. 100 ccm).
+	+	+	desgl.	desgl.	—	Endgem. (ca. 100 ccm)
+	+	+	Nach 3 1/2 Std. nicht entfärbt.	—	1,1	Endgemerk (50 ccm).
+	+	+	Nach 4 Std. unverändert.	Nach 3 1/2 Std. unverändert.	—	
+	+	+	Nach 3 Std. keine Entfärb.	Nach 3 Std. keine Entfärb.	—	Milch vom 9. X.
+	+	+	desgl.	desgl.	—	desgl.
+	+	+	Binnen 10 Min. fast entfärbt, nach 40 Min. wieder mehr gefärbt.	Binnen 3 Min. farblos.	1,0	
+	+	+	Nach 2 Std. unverändert.	Nach 2 Std. unverändert.	—	Abendgemerk.
+	+	+	Nach 1/2 Std. fast farblos, nach 2 Std. noch nicht ganz entfärbt.	Binnen 3 Min. farblos.	—	Milch vom 6. X.
+	+	+	Nach 40 Min. farblos, nach 2 Std. z. T. wieder blau.	Nach 20 Min. fast farblos.	—	Milch v. 6. X. (jedenf. Bakterienwirkung).
+	+	+	Bis nach 2 Std. keine Entfärbung.	Bis nach 2 Std. keine Entfärbung.	0,5	
+	+	+	Nach 2 Std. unverändert.	desgl.	—	Milch vom 5. X.
+	+	+	Nach 2 Std. unverändert.	Binnen 3 Min. farblos.	—	desgl.
+	+	+	Nach 40 Min. farblos, nach 2 1/4 Std. wieder blau.	Nach 20 Min. fast farblos.	—	Milch v. 5. X. (Bakterienwirkung).
+	+	+	Binnen 2 Std. keine Entfärbung.	Binnen 2 Std. keine Entfärbung.	0,8	
+	+	+	Nach 3 1/2 Std. noch nicht entfärbt.	Nach 2 1/2 Std. keine Entfärbung.	0,8	
+	+	+	Nach 3 Std. noch nicht entfärbt.	Nach 2 1/2 Std. noch nicht entfärbt.	0,7	
+	+	+	Binnen 3 1/2 Std. nicht entfärbt.	Nach 3 Std. nicht entfärbt.	1,1	
+	+	+	Nach 1/2 Std. abgebläst, nach 3 Std. noch nicht ganz entf.	In 1 Std. entfärbt.	—	Bakterienwirkung.
+	+	+	Nach 2 1/2 Std. noch n. entf.	Nach 2 1/2 Std. unverändert.	—	
+	+	+	Nach 2 Std. unverändert.	Nach 2 Std. unverändert.	—	
+	+	+	Nach 1 Std. nicht verändert.	In 3 Std. farblos.	—	
+	+	+	Nach 4 1/2 Std. nicht verändert.	Nach 2 1/4 Std. etw. entfärbt.	—	
+	+	+	Nach 3 1/2 Std. keine Veränd.	Nach 3 1/2 Std. keine Veränd.	—	Anfangsgem. 100 ccm
+	+	+	desgl.	desgl.	—	Endgemerk 100 com.
+	+	+	Nach 3 Std. keine Veränderungen.	desgl.	—	Anfangsgemerk.
+	+	+	desgl.	desgl.	—	Endgemerk.
+	+	+	desgl.	desgl.	—	Mischmilch.
+	+	+	desgl.	desgl.	—	desgl.
+	+	+	desgl.	desgl.	—	Abend- und Morgenmilch gemischt.
+	+	+	desgl.	desgl.	—	desgl.
+	+	+	desgl.	desgl.	—	desgl.

milchproben beobachtet worden war. Da die vorliegenden Proben zum größten Teil von mir selbst entnommen waren, so ist die Anwesenheit von Substanzen (Konservierungsmitteln wie Kaliumbichromat, Kupferammoniumsulfat), die die F.-M.-Reaktion in negativem Sinne beeinflussen, ausgeschlossen [Hesse¹⁾]. Bei 5 Proben, nämlich 2 (20 Stunden alt), 2 b (48 Stunden alt), 2 c, 3 c und 7 a, drei 72 Stunden alten Proben, zeigten sich Unregelmäßigkeiten im Verhalten gegen das Schardingersche F.-M.-Reagens: Entfärbung in 30 bis 40 Minuten, die wohl auf Bakterienwirkung zurückzuführen sind, da auch das M.-Reagens in kurzer Zeit entfärbt wurde.

Die Mischmilch von 4 Ziegen, die vor 4 Monaten gelammt hatten und am Ende der Lactation (im Dezember) standen, zeigte dasselbe Verhalten wie die Einzelmilch derselben Ziegen in den ersten Monaten der Lactation.

Colostralmilch von Ziegen konnte nicht geprüft werden, da solche zur Zeit der Untersuchung nicht zur Verfügung stand.

Da Ziegenvollmilch die F.-M.-Reaktion nicht gab und nach den meisten Autoren der Rahm der Kuhmilch eine erhöhte Fähigkeit hat, das F.-M.-Reagens zu entfärben, so wurde Ziegenmilch durch Zentrifugieren mittels einer elektrischen Zentrifuge (3500 Umdrehungen pro Minute) entrahmt und der Rahm allein mit dem F.-M.-Reagens geprüft. Bei Anwendung der gleichen Mengenverhältnisse (10 ccm Rahm, 1 ccm F.-M.-Reagens) ist die Rahm-F.-M.-Mischung vom Moment der Mischung an im Vergleich zu Vollmilch + F.-M.-Reagens blaßblau gefärbt. Die Farbe blaßt im Wasserbad von 50° noch mehr ab, was wohl mit der Verteilung des Farbstoffes in der voluminösen Masse zusammenhängt, aber vollkommene Entfärbung konnte auch nach 2 Stunden nicht beobachtet werden. Steigert man den Zusatz von F.-M., indem man 2 ccm F.-M. zu 10 ccm Sahne setzt, so bleibt der anfängliche Farbenton bestehen. Die verwendete Sahne enthielt 20,7% Fett.

Bei einer anderen Probe von Ziegenmilchsahne wurde vollkommene Entfärbung auch nicht beobachtet. Die von der Sahne abgeschleuderte Magermilch verhielt sich gegen das F.-M.-Reagens

¹⁾ Hesse, Die Schardingersche Reaktion zur Unterscheidung roher von gekochter Milch. Milchwirtschaftl. Centralbl. 4, 49, 1908. — Weitere Versuche betreffend den Nachweis von gekochter Milch. Ebenda 5, 544, 1909.

ebenso wie die Ziegenvollmilch, sie entfärbte nicht. Zur weiteren Prüfung, ob Ziegenmilch geringe Mengen F.-M.-Reduktase enthält, wurden Milchproben (Anfangs- und Endgemelk von 2 verschiedenen Ziegen [I u. II]) mit 1 ccm und 0,25 ccm F.-M.-Reagens versetzt und beobachtet. Die Färbung mit 0,25 ccm war natürlich bedeutend schwächer; zur Kontrolle der Farbenveränderung wurde gekochte Ziegenmilch in gleichen Mengenverhältnissen mit F.-M.-Reagens versetzt. Wie aus der Übersicht hervorgeht, wird aber auch diese geringe Menge F.-M. nicht vollkommen entfärbt. Die anfänglich blaßblaue Farbe wird etwas schwächer, aber verschwindet nicht. Um die möglicherweise schädigende Wirkung des Formaldehyds (Bredig, Sommer u. a.) auszuschalten, wurde ein F.-M.-Reagens verwendet, das nur die Hälfte der gewöhnlichen Menge Formaldehyd enthielt; auch damit konnte eine Entfärbung nicht beobachtet werden.

Tabelle III.

	Farbe der Mischung	Temp. = 45 bis 50°
10,0 ccm A.-M. I	normal blau	Bis nach 2 Std. Farbe unverändert.
+ 1,0 " F.-M.		
10,0 " E.-M. I	"	desgl.
+ 1,0 " F.-M.		
10,0 " A.-M. II	"	desgl.
+ 1,0 " F.-M.		
10,0 " E.-M. II	"	desgl.
+ 1,0 " F.-M.		
10,0 " A.-M. I	blaßblau	Nach 13 Min. etwas blasser, bis n. 2 Std. noch nicht entfärbt.
+ 0,25 " F.-M.		
10,0 " E.-M. I	"	desgl.
+ 0,25 " F.-M.		
10,0 " A.-M. II	"	Bis nach 2 Std. Farbe unverändert.
+ 0,25 " F.-M.		
10,0 " E.-M. II	"	Bis nach 2 Std. etwas abgeblaßt.
+ 0,25 " F.-M.		
10,0 " Kuhmilch roh	normal blau	Binnen 5 Min. farblos, nach 2 Std. noch farblos.
+ 1,0 " F.-M.		
10,0 " Kuhmilch gek.	"	Bis nach 2 Std. unverändert blau.
+ 1,0 " F.-M.		
10,0 " Ziegenmilch gek.	"	desgl.
+ 1,0 " F.-M.		
10,0 " Ziegenmilch gek.	blaßblau	Bis nach 2 Std. nicht verändert.
+ 0,25 " F.-M.		

A.-M. = Anfangsmilch; E.-M. = Endmilch.

Nach dem Ergebnis der Versuche mit Ziegenmilchsahne und der mit geringeren Mengen F.-M.-Reagens versetzten Ziegenmilchproben enthält sie ein das F.-M.-Reagens reduzierendes Enzym nicht.

Leider konnte das Verhalten des Rahms einer nicht reagierenden Kuhmilch nicht geprüft werden, da unter den als Kontrollen verwendeten Kuhmilchproben eine solche nicht beobachtet wurde. Nach den Angaben Römers¹⁾ ist anzunehmen, daß der Rahm solcher Milch entfärbt.

Beim Versetzen roher oder gekochter Ziegenmilch mit Schardingers Reagens und n-NaOH trat je nach der Menge der zugesetzten Lauge Entfärbung nach verschieden langer Zeit ein. Es mußte in jedem Falle so viel NaOH zugesetzt werden, bis die betreffende Probe gegen Lackmus alkalisch reagierte. Der Zusatz von 0,2% iger Ferrosulfatlösung (Römer) bewirkte sowohl in roher als in gekochter Ziegenmilch mit Schardingers Reagens mehr oder weniger schnelle Entfärbung. Die hier untersuchten Ziegenmilchproben verhielten sich ebenso wie die von Römer beobachteten Kuhmilchproben, die das F.-M.-Reagens erst nach Zusatz von Natronlauge oder Ferrosulfat zu entfärben vermochten, dagegen unterschieden sie sich allgemein von Kuhmilch durch das Fehlen der die F.-M.-Reaktion auslösenden Fermentes und außerdem durch einen geringeren Gehalt an Katalase.

Da das Schardingersche Enzym ein originäres Ferment ist, kann auch die Milchdrüse der Ziege dieses nicht enthalten (Grimmer), und die Annahme von Römer und Sames²⁾, daß mit reichlicher Fettausscheidung auch reichlich F.-M.-Reduktase von der Milchdrüse abgegeben wird, trifft für die Ziege nicht zu.

Die F.-M.-Reaktion kann deshalb für Ziegenmilch zur Beurteilung gewisser Zustände des milchliefernden Tieres oder zur Prüfung der hygienischen Beschaffenheit, wie dies in den letzten Jahren für Kuhmilch vielfach vorgeschlagen worden ist, nicht herangezogen werden.

¹⁾ P. H. Römer, Zur Schardingerschen Reaktion der Kuhmilch. Diese Zeitschr. 40, 5, 1912.

²⁾ P. H. Römer und Th. Sames, Beiträge zur Schardingerschen Reaktion der Kuhmilch. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 20, 1, 1910.

Die schon erwähnte Annahme mancher Forscher, daß das Milchfett der Träger des die F.-M.-Reaktion auslösenden Fermentes sei, läßt sich nicht ohne weiteres verallgemeinern und trifft für die oft sehr fettreiche (bis zu 7⁰/₀ beobachtet) Ziegenmilch nicht zu. Auch ist der Alkalitätsgrad, mit dem Kooper¹⁾ die Peroxydasereaktion in Zusammenhang bringt, für die Erklärung des Ausfalles der F.-M.-Reaktion bei der einen hohen Alkalitätsgrad aufweisenden Ziegenmilch ohne Einfluß.

Bemerkenswert ist, daß zwei so nahestehende Tierarten — Kuh und Ziege — eine Verschiedenheit in bezug auf den Fermentgehalt der Milch oder der Milchdrüse zeigen (Grimmer).

Zusammenfassung.

1. Formaldehyd-Methylenblaulösung nach Schardinger wird von roher frischer bis einige Tage alter Ziegenmilch nicht entfärbt. Sie enthält also das die Reaktion auslösende Ferment nicht.

2. Eine 1⁰/₀ige Wasserstoffsperoxydlösung wird nur in geringem Grade von frischer roher Ziegenmilch zersetzt. Sie enthält also nur geringe Mengen des Fermentes, Katalase.

3. Das Rothenfußersche, das Storchsche Reagens und das Benzidinreagens werden von roher frischer Ziegenmilch ebenso entfärbt wie von Kuhmilch.

4. Ein Unterschied in bezug auf den Gehalt an dem die F.-M.-Reaktion auslösenden Ferment zwischen Anfangs-, Misch-, Endmilch, Milch, die von säugenden und nichtsäugenden Ziegen stammt, und Milch von an Abortus erkrankten Ziegen besteht nicht.

5. Ziegenmilchsahne entfärbt das F.-M.-Reagens ebenfalls nicht.

¹⁾ W. D. Kooper, Sind Alkalität und Peroxydase der Milch identische Begriffe? Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 23, 1, 1912.

**Bemerkung zu der Mitteilung von L. Michaelis:
„Eine neue Mikroanalyse des Zuckers“.**

Diese Zeitschr. 59, 166, 1914.

Von

Oscar Kraus.

(Eingegangen am 13. Februar 1914.)

Am 18. November 1912 haben Max Adler und ich in der Berliner klinischen Wochenschrift kurz über eine neue Methode der Blutzuckeruntersuchung berichtet, bei der 1 ccm Blut durch Einstich in die Fingerkuppe gewonnen und quantitativ analysiert wird. Die Enteiweißung erfolgte nach einer von Max Adler vorgeschlagenen Modifikation der Methode von Michaelis und Rona auf heißem Wege, die Zuckerbestimmung mit Hilfe einer Zehntel-Fehling-Lösung.

Wir haben also bereits vor zwei Jahren mikrochemische Bestimmungen des Blutzuckers vorgenommen und hierzu das vortreffliche Verfahren der genannten Autoren in ähnlicher Weise modifiziert, wie dies Michaelis im Januarhefte dieses Jahres in dieser Zeitschrift beschreibt.

Wir haben nämlich bereits damals „die Enteiweißung des Vollblutes durch Kombination der Hitzeoagulation und der Adsorption durch Eisenhydroxyd“ erzielt. Auch wir haben 1 ccm in einer Pipette abgehoben usw. Das Verfahren ist ausführlich in Nr. 18, 26 und 47 der Wiener med. Wochenschr. Jahrg. 1913 mitgeteilt worden. In den beiden letzteren Veröffentlichungen habe ich die Titration mit der Zehntel-Fehling-Lösung durch eine solche mit einer Rhodankalium-Kupferlösung ersetzt.

Diese Bemerkungen halte ich auch aus diesem Grunde für angebracht, weil auch I. Bang unsere diesbezüglichen Publikationen übersehen zu haben scheint; wenigstens erwähnt er in seinen Veröffentlichungen über den Blutzucker unser Verfahren mit keinem Worte, trotzdem es vor dem seinen mitgeteilt worden ist.

Einige Abänderungen der Methode der Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl.

Von
Rob. Hottinger.

(Biologisch-zootechnisches Institut Escola Polytechnica São Paulo, Brasil.)

(Eingegangen am 23. Dezember 1913.)

Mit 1 Figur im Text.

Für kaum eine andere Methode hat man so viele Vorschläge zur Abänderung gemacht wie für die von Kjeldahl. Meistens sind es unwesentliche Verbesserungen in der Apparatur oder im Anschluß der Materie.

Die nachstehende Abänderung betrifft namentlich die Apparatur, aber auch die Art der Ammoniakdestillation.

Der Anschluß erfolgte nach den Literaturangaben mit Kupfersulfat und Kaliumsulfat als Kontaktsubstanzen. Wesentlich vorteilhafter gegenüber den gebräuchlichen Analysenmethoden erscheinen mir die Modifikationen der Destillation, die nachstehend erörtert werden sollen.

1. Der Destillationsaufsatz. Alle Destillationsaufsätze, die ich durchprobiert habe, erwiesen sich teilweise als zu groß, zu schwerfällig, zu teuer und zu wenig sicher. Im Prinzip wird man in erster Linie vermeiden wollen, daß von der Natronlauge des Destillationsgefäßes Material in die titrierte Schwefelsäure gelangt. Zu diesem Zwecke sind die obigen Destillationsgefäße mit Kugeln, Tropfenfängern, schlangenförmigen Windungen usw. versehen. Teilweise ist auch die Größe derart gewählt, daß der Weg des destillierenden Ammoniaks sehr verlängert wird.

Diese Aufsätze haben den großen Nachteil, daß sie in zu großem Umfange mit der äußeren Temperatur in Berührung

stehen. Das Destillat kondensiert an den Kugel- und Röhrenwandungen und fließt wieder in den Destillationskolben zurück. Die Destillation gestaltet sich dadurch sehr langwierig.

Um diese Übelstände zu vermeiden, wurde der in der Figur dargestellte Destillationsaufsatz hergestellt. Durch den Pfropfen des Destillationsgefäßes gehen 2 Röhren. Die eine, *A*, nimmt ein kurzes Röhrrchen mit einem langen Lippenventil¹⁾ auf, durch das die Natronlauge eingeführt wird, nach-

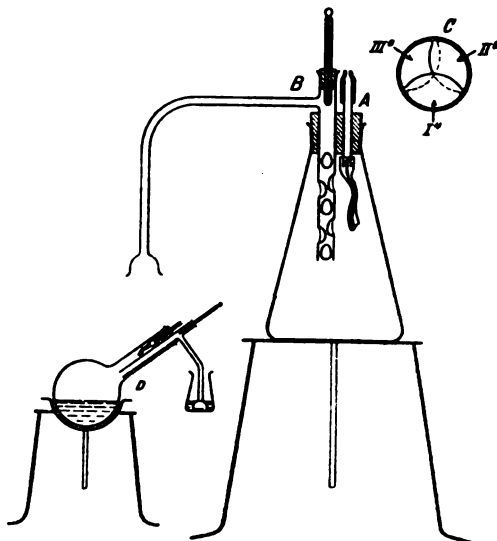


Fig. 1.

dem die aufgeschlossene Substanz in den Erlenmeyer übergeführt wurde²⁾. Diese Anordnung bietet den hauptsächlichsten Vorteil, daß zur Einführung der Lauge der Pfropfen nicht mehr abgehoben werden muß. Das Lippenventil wird

¹⁾ Meist wurde das Lippenventil selbst hergestellt. Die im Handel am meisten verwendeten Ventile sind etwas zu kurz. Hergt, Kautschukhandlung in Zürich, besorgte besonders lange Ventile, die sich gut bewährten. Selbsterstellung: Zwei Kautschukstreifen (aus Luftreifen einer Pneumatik) von etwa $1\frac{1}{2}$ cm Breite werden an den Rändern mit Kautschuklösung bestrichen und leicht vulkanisiert mit einer verdünnten Lösung von S_2Cl_2 in Schwefelkohlenstoff (Pneumatikgummilösung ist nicht verwendbar). Länge des Ventils etwa 7 cm.

²⁾ Sehr leicht gelingt die Destillation aus dem etwas groß (ca. 400 ccm) gewählten Aufschlußkolben.

mit Natronlauge benetzt und folgt nun den kleinsten Druckschwingungen im Kolben, d. h. bei Druckverminderungen, die sonst ein Zurücksteigen der titrierten Säure verursachen würden, öffnet sich das Ventil, wodurch die Gefahr des Verlustes der Analyse vollständig aufgehoben ist. (Bei den üblichen Apparaturen wird, um dies zu vermeiden, eine Kugel am Destillationsaufsatz angeblasen, die die zurücksteigende Säure aufnimmt.) Das Ventil hat sich in jahrelanger Praxis bestens bewährt und wird von jedem neuen Assistenten bevorzugt, ebenso wie der Destillationsaufsatz *B*, der durch eine zweite Öffnung des Pfropfens durchgeführt wird.

Dieser Aufsatz stellt eine einfache Glasröhre dar, die mit dem Rückflußteile so wenig wie möglich mit der Außenluft in Berührung steht, d. h. die Dephlegmation findet im Innern des Kolbens statt. Das destillierende Ammoniak hat möglichst wenig Gelegenheit, sich zu kondensieren und in den Erlenmeyer zurückzufließen. Das Röhrende im Kjeldahl-Kolben hat Einbuchtungen, die sich so gegenüberstehen, daß je 3, spiralförmig angeordnet, den freien Durchgang der Röhre abschließen und aufsteigende Dämpfe zwingen, gegen diese Einbuchtungen oder gegen die Röhrenwand zu stoßen. Versuche haben gezeigt, daß schon 3 solcher Einbuchtungen, richtig angeordnet (Fig. C), vollkommen genügen, um eine stark stoßende Flüssigkeit zurückzuhalten. Immerhin wurden vorsichtshalber 6 bis 9 solcher Einbuchtungen angebracht. Die Einbuchtungen wurden teilweise derart hergestellt, daß an der betreffenden Stelle mit kleiner Flamme das Glas angewärmt und durch Saugen an der einseitig geschlossenen Röhre zur Eindellung gebracht wurde, oder dadurch, daß mit leicht angewärmtem LötKolben usw. die erweichte Glaswand eingepreßt wurde. In letzterem Falle hat man besonders zu berücksichtigen, daß bei schlechter Kühlung das Glasrohr springen kann.

Unmittelbar über dem Pfropfen ist ein T-Stück angeschmolzen, dessen langer Schenkel, eine einfache, knieförmig gebogene Röhre, in die Schwefelsäure taucht. Das untere Ende dieser Röhre ist halbkugelförmig aufgeblasen, um eine größere Berührungsoberfläche mit der Säure zu erhalten.

2. Alkoholzusatz. Aus der Figur ist ersichtlich, daß das verlängerte Rohr ein Thermometer trägt, das die Tem-

peratur der destillierenden Flüssigkeit angibt. Dieses Thermometer wurde angebracht, da es sich als wertvoll erwies, in den Erlenmeyer-Kolben mit der verdünnten Schwefelsäure Alkohol einzuführen und so nach Alkalisierung eine alkoholische Lösung zu destillieren.

Je nach der Konzentration des Alkohols wird der Siedepunkt wesentlich heruntersetzt. Er wird zu etwa 80° gewählt. Die Destillation beginnt rascher, die Alkoholdämpfe nehmen das Ammoniak leichter auf als Wasser, und es hat sich gezeigt, daß die Destillation immer beendet war, wenn die Temperatur auf den Siedepunkt des Wassers gestiegen ist. Es ist also in diesem Falle die Destillation beendet, wenn sie nach der alten Methode erst begonnen hat.

Die Handhabung des Apparates erscheint leichter als die des alten. Das Einfüllen der Lauge durch das Ventil geschieht ohne Gefahr eines Ammoniakverlustes. Durch das Ventil wird ein Zurücksteigen der Schwefelsäure vermieden. Der Destillationsaufsatz verhindert durch seine Einbuchtungen ein Übertreten von Natronlauge in die titrierte Säure. Die gedrungene Bauart beschränkt eine Kondensation der Dämpfe und Zurückfließen der Flüssigkeit in den Kolben, soweit es möglich ist. Der Zusatz von Alkohol erleichtert die Destillation. Das Thermometer gestattet schon von weitem die Beurteilung des Standes der Destillation.

Nachstehende Versuche mögen die Brauchbarkeit des neuen Apparates noch näher dartun.

Die Versuche wurden von meinem Assistenten, Octavio B. de Goveia, ausgeführt. Die Resultate dieser Versuche, die im *Anuario da Escola Polytechnica de São Paulo para o anno 1913* ausführlich wiedergegeben sind, lassen sich kurz folgendermaßen zusammenfassen.

Der Alkohol beschleunigt die Destillation des Ammoniaks bedeutend; es werden im allgemeinen $\frac{2}{3}$ an Zeit gewonnen, indem eben die niedersiedenden Alkoholgemische den Ammoniak leicht mit sich reißen. Das Thermometer gestattet eine genaue Überwachung des Destillationsprozesses. Ist das Alkoholgemisch richtig gewählt (33%), so ist sämtlicher Ammoniak übergeführt, wenn das Thermometer etwa 1 bis 2° unter dem Siedepunkt des Wassers steht; hier in São Paulo etwa bei 96° . Ist diese

Temperatur erreicht, kann man ruhig die Destillation unterbrechen, ohne daß man etwa nötig hätte, mit Reagenspapier nachzuprüfen, ob die Dämpfe noch alkalisch reagieren. Diese Prüfung ist übrigens sehr leicht auszuführen, indem das Thermometer herausgenommen wird und das Reagenspapier in die für dasselbe bestimmte Öffnung eingeführt wird.

Die Versuche zeigten, daß die übrigen Destillationsaufsätze — es wurde der Apparat Wagner gebraucht — sehr leicht eine kleinere Ausbeute an Ammoniak ergeben. So wurde beispielsweise gefunden, daß dann, wenn im Apparat Wagner die Destillation beendet erschien, die Dämpfe also kein Ammoniak mehr mit sich zu führen schienen, 0,2 ccm $\frac{N}{5}$ -Ammoniak im Apparate Wagner fehlten. In obigem Apparate wurde beispielsweise gefunden: 24,86 ccm $\frac{N}{15}$ -Ammoniak, im Apparate Wagner: 24,65 ccm $\frac{N}{15}$ -Ammoniak.

Um zu entscheiden, worauf diese Differenz beruhe, wurde die Destillation fortgesetzt, indem die Schwefelsäure durch Salzsäure ersetzt wurde. Bei weiterer Destillation wurden im Apparate Wagner noch 0,23 ccm Ammoniak gefunden, also annähernd obige Differenz.

Diese und ähnliche Versuche wurden vom Assistenten O. de Goveia in Parallele ausgeführt. Nachstehende Tabelle gibt Aufschluß über deren Verlauf.

Tabelle.
Destillationsversuch aus alkalisierter Am_2SO_4 -Lösung.

Obige Destillationsanordnung		Übliche Destillation	
$\frac{N}{5}$ -NaOH ¹⁾ nach Destillation	Abweichung vom Mittelwert	$\frac{N}{5}$ -NaOH	Abweichung vom Mittelwert
10,15	+ 0,01	10,25	- 0,17
10,18	+ 0,04	10,60	+ 0,18
10,12	- 0,02	10,75	+ 0,33
10,10	- 0,04	10,28	- 0,14
10,13	- 0,01	10,21	- 0,21
10,14 ccm		10,42 ccm	

Mittlerer Fehler der Einzelbestimmung:

$$\sqrt{\frac{\sum \delta^2}{\eta - 1}} = \pm 0,027 \text{ ccm NaOH}, \quad \sqrt{\frac{\sum \delta^2}{\eta - 1}} = \pm 0,23 \text{ ccm NaOH}.$$

¹⁾ Vorgelegt 27,24 ccm $\frac{N}{5}$ - H_2SO_4 (empirische Lösung 25 ccm).

Es könnte der Einwand erhoben werden, daß vielleicht Natronlauge mitgerissen worden sei. Um dies zu prüfen, wurde die vorgelegte titrierte Salzsäure in einigen Versuchen verdampft, gegläht, wobei sich herausstellte, daß in keinem Falle Silbernitrat eine Reaktion ergab, daß also kein NaCl sich gebildet hatte.

Werden diese letzten 0,2 ccm Ammoniak bei den alten Apparaten bestimmt, so ist eine längere Destillation notwendig. Es scheint, als ob die Wandungen der Kugeln, die eine große Oberfläche darbieten, hartnäckig Ammoniakdämpfe absorbiert zurückhielten, und daß diese letzten Reste erst bei prolongierter Destillation mitgenommen würden.

Man könnte annehmen, daß der Alkohol, auch in den alten Apparaten verwendet, dieselben Dienste leisten könnte. Es hat sich aber herausgestellt, daß ein Zufügen von Alkohol nicht tunlich ist. Es ergeben sich Verluste von fast 1 ccm $\frac{2}{3}$ -Ammoniak, die wohl darauf zurückgeführt werden können, daß schon bei der Alkalisierung die Temperatur derart steigt, daß Alkoholdämpfe mit Ammoniak entweichen, bevor der Aufsatz angebracht werden kann.

Bekanntlich ist bei der Destillation oft ein Siedeverzug und damit verbundenes Stoßen der Flüssigkeit äußerst unangenehm. Es hat sich gezeigt, daß durch Alkoholzusatz das Stoßen vollständig aufgehoben wird, und zwar nur in dem Falle, wenn die Konzentration annähernd 33% beträgt. Man wird also auf je 100 ccm Lauge etwa 50 ccm rektifizierten Alkohol in den Erlenmeyer einbringen, wobei man die Menge der nötigen Natronlauge berücksichtigt. Wird die Konzentration des Alkohols gesteigert, so treten Siedeverzüge auf und somit Stoßen. Bei zu geringer Konzentration hätte man zu befürchten, daß der Alkohol überdestilliert, ohne alles Ammoniak mitgerissen zu haben.

Zusammenfassung.

Die Destillation gestaltet sich folgendermaßen:

Das Säuregemisch wird in dem Erlenmeyer mit Wasser übergespült, wobei ungefähr die Menge der Gesamtflüssigkeit bestimmt wird. Nunmehr wird auf je 100 ccm Lösung ungefähr 50 ccm Alkohol zugefügt, also die Hälfte der Lösung

an Alkohol, der Destillationsaufsatz aufgesetzt, mit Thermometer versehen, die Endöffnung in die Schwefelsäure gesetzt und schließlich durch das Lippenventil aus einer Pipette oder durch ein kleines aufgesetztes Trichterchen die nötige Menge Natronlauge hinzugefügt. Ein kurzes Durchmischen im Erlenmeyer-Kolben ist angezeigt. Es ist nicht nötig, Talg, Zink oder andere Substanzen, die den Siedeverzug aufheben sollen, hinzuzufügen. Die Destillation geht glatt vor sich und kann unterbrochen werden, wenn das Thermometer 1° unter dem Siedepunkt des Wassers steht (in São Paulo, bei etwa 800 m Höhe, bei 96°).

Ist das Ventil richtig gewählt, intakt, lang genug, so wird dasselbe den leisesten Druckschwankungen im Kolben folgen, was sehr leicht durch Abkühlen der Kolbenwand zu konstatieren ist, wobei das Ventil Luft eintreten läßt, ohne daß sich im Destillationsrohr die vorgelegte Säure mehr als etwa 2 cm heben könnte.

Die Resultate bei dieser Destillation sind, wie zahlreiche Versuche zeigten, bedeutend genauer als die mit den alten Apparaten, und außerdem ist die Destillation bedeutend schneller beendet. Man gewinnt meistens $\frac{2}{3}$ an Zeit.

Beachtenswert ist die Anordnung Fig. D. Die Verbrennung wird in einem Kolben von mindestens 500 ccm vorgenommen. Nach Abkühlen und Verdünnen mit Wasser wird rektifizierter Alkohol zugefügt, wie oben angegeben; der Destillationsaufsatz ist, wie aus Fig. D ersichtlich, im Kühlrohr weniger gebogen, um, wie abgebildet, aus schrägem Kolben destillieren zu können. Nach Anbringen des montierten Pfropfens wird die Natronlauge zugefügt und auf dem Verbrennungsgestell destilliert.

Auf diese Art wird die Operation noch weiterhin abgekürzt und an Glasmaterial gespart.

Ein Beitrag zur Kenntnis des Stoffwechsels während der Narkose.

Von
E. Pawel.

(Aus der Medizinischen Klinik der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 13. Februar 1914.)

Mit 3 Figuren im Text.

Die Narkotica sind seit ihrer Einführung in den ärztlichen Arzneimittelschatz stets ein Gegenstand eifrigen Studiums gewesen, und auf die verschiedenste Weise hat man sich ihre Wirkung, die Art und den Ort ihres Angreifens im Organismus zu erklären versucht.

Die Theorie Claude Bernards, nach der das Narkoticum eine Semikoagulation der Nervenzelle bewirken solle, und die von Bibra und Harleß (1847), daß die Narkose in einer Auslaugung der Gehirnfette durch das Narkoticum bestehe, haben wohl nur noch historischen Wert.

1866 kam Hermann¹⁾ auf Grund der Tatsache, daß die Narkotica die roten Blutkörperchen auflösen und diesen lipoide Stoffe (Lecithin, Cholesterin, Fette) eigentümlich sind, zu dem Schluß, „daß diese Stoffe den Angriffspunkt der Narkotica im Organismus bilden“. Endlich zeigten unabhängig voneinander Meyer²⁾ und Overton³⁾ (1899 bis 1901), daß die Wirkungstärke der Narkotica nicht so sehr ihren chemischen Eigenschaften als vielmehr einer physikalischen, nämlich ihrem Teilungskoeffizienten Fett:Wasser, parallel gehe, so daß ihre Wirkung wohl im wesentlichen als eine Funktion ihrer Lipoidlöslichkeit aufgefaßt werden könne. Sie stellten auch die Theorie auf, daß die

¹⁾ Reicherts und Du Bois-Reymonds Arch. f. Anatomie, Physiologie u. wiss. Med.

²⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Therap. 42, 1899.

³⁾ Studien über die Narkose. Jena 1901.

Narkose in einer Lösung des Narkoticums in den Lipoiden der Zelle bestehe.

Damit war jedoch über das Wesen der Narkose nichts gesagt. Denn wenn die Anwesenheit der Narkotica in den Nervenzellen eine solche Zustandsänderung des Organismus hervorruft, wie sie sich nach außen durch die Narkose kundgibt, so müssen ihr auch Veränderungen in der Zelle selbst entsprechen. Die exakte Frage: Welche Veränderungen im Zellstoffwechsel sind für das Zustandekommen des Narkosezustandes charakteristisch? hat als Erster Verworn (1906 bis 1909) gestellt und sie mit einer großen Zahl von Arbeiten aus seinem Institute beantworten lassen, die alle, wie verschieden auch die Versuchsanordnungen waren, eindeutig waren in dem Ergebnis: Mit dem Zustandekommen der Narkose ist eine Lähmung der Assimilationsfähigkeit der Zellen für Sauerstoff verknüpft.

Die Versuchsmethodik der ersten Arbeiten [von Winterstein¹⁾ und Fröhlich²⁾] beruhte auf folgendem Gedankengange Verworns: Ein Frosch, dem man durch Verdrängen des Blutes mit sauerstofffreier physiologischer NaCl-Lösung alles Ersatzmaterial einschließlich des Sauerstoffs fernhält, läßt sich durch fortgesetzte Reize nach einer gewissen Zeit auf den Punkt der Reaktionslosigkeit bringen, der für Nerv und Nervenzentrum ein Stadium der höchsten Assimilationsfähigkeit darstellt (Hering). Wird diesem Präparat nun O₂-haltige Spülflüssigkeit geboten und diese wieder verdrängt durch O₂-freie, so hat sich das Präparat erholt, d. h. erst eine Reihe fortgesetzter Reize ist notwendig, um es wieder auf den Zustand der Reaktionslosigkeit zu bringen. Narkotisiert man nun aber den auf dem Zustande der Reaktionslosigkeit befindlichen Frosch, bietet ihm dann durch Durchspülen mit frischem, O₂-haltigem Blute neues Ersatzmaterial und verdrängt nach Aufhören der Narkose dieses Blut wieder durch O₂-freie NaCl-Lösung, so wird die Erholung ausbleiben, wenn die Narkose die Sauerstoffassimilation gelähmt hatte, wird aber wie früher eintreten, wenn die Narkose die Assimilationsfähigkeit unbeeinflußt ließ.

¹⁾ Verworn Zeitschr. f. allg. Physiol. 1, 19; 5, 233.

²⁾ Ebenda 3, 75.

Mit dieser klaren biologischen Methode gelang es Winterstein¹⁾, für das Zentralnervensystem einwandfrei festzustellen, daß während der Narkose (geprüft wurden Chloroform, Äther, Alkohol und Kohlensäure) eine Verminderung des Sauerstoffverbrauchs durch direkte Behinderung der O₂-Atmung eintrete. Fröhlich²⁾, der nach der gleichen Methode Versuche am peripheren Nerven anstellte, kam zu dem Schluß, „daß durch die Narkose Nerv und Ganglienzelle in gleicher Weise beeinflußt werden. Bei beiden wird in der Narkose die Assimilation von Sauerstoff gelähmt“.

Nagai³⁾ untersuchte den Stoffwechsel des Flimmerepithels von Paramecium und fand, daß die Narkotica die Sauerstoffaufnahme des Flimmerepithels ebenso wie beim zentralen und peripheren Nervensystem verhindern.

Auf Grund dieser Arbeiten sowie ähnlicher von Bondy und Heaton faßt Verworn⁴⁾ sein Urteil über das Wesen der Narkose folgendermaßen zusammen: Das Gleichgewicht zwischen Assimilation und Dissimilation erfährt unter dem Einfluß des Narkoticums Veränderungen. Während der Narkose sind die Oxydationsprozesse gelähmt. Die lebendige Substanz nimmt während der Narkose keinen Sauerstoff auf, selbst wenn er in reichlicher Menge zur Verfügung steht und selbst wenn durch Ermüdung oder Erstickung das Sauerstoffbedürfnis enorm gesteigert ist.

Ähnliche Gedankengänge leiteten später, doch unabhängig von Verworn, Mansfeld⁵⁾. Wenn durch das Eindringen der Narkotica (infolge Lipoidlöslichkeit) in die Lipoider der Zelle (nach Meyer und Overton) die Narkose hervorgerufen wird, so muß die Narkose eine Störung der normalen Funktion der Lipoider bedeuten. Da nun auch der Sauerstoff, wie man weiß, einen großen Teilungskoeffizienten Fett:Wasser zugunsten des ersteren besitzt, so erblickt Mansfeld⁶⁾ die physiologische Be-

¹⁾ l. c.

²⁾ l. c.

³⁾ Verworns Zeitschr. f. allg. Physiol. 5, 34.

⁴⁾ Deutsch. med. Wochenschr. 1909, Nr. 37.

⁵⁾ Arch. f. d. ges. Physiol. 129, 69.

⁶⁾ l. c.

deutung der Lipide darin, daß sie das Eindringen von Sauerstoff in das Innere der Zelle ermöglichen. Die Narkose wäre demnach eine partielle Sauerstoffarmut der Nervenzellen, hervorgerufen dadurch, daß die Nervenzellen den ihnen zu Gebote stehenden Sauerstoff nur in unzureichender Weise aufnehmen können.

Auch Bürker¹⁾ kam bei elektrolytischen Untersuchungen der Narkotica zu dem Resultat, die Narkose sei eine Anhäufung des Narkoticums (infolge Lipidlöslichkeit) im Nervensystem und „die Folge einer chemischen Bindung des Narkoticums mit dem aktiven Sauerstoff der nervösen Substanz, nämlich eine temporäre Erstickung mit Lähmung der physiologischen Funktion“.

Es ist nach dem Angeführten wohl als erwiesen anzusehen, daß die Narkose die Oxydationsfähigkeit der Nervenzellen primär lähmt. Nun zeigen aber auch Versuche, die an einzelligen Lebewesen, an Flimmerepithel, an isoliertem Muskelgewebe, kurz an der verschiedenartigsten lebenden Substanz angestellt wurden, und die in der Literatur sich zahlreich vorfinden, daß nicht nur die Nervenzellen, sondern alle Gewebe des Organismus durch gewisse, nach der Individualität des Gewebes verschiedene Konzentrationen der Narkotica in ihrer Fähigkeit, Sauerstoff zu binden, geschädigt werden. Dieser Wirkung der Narkotica müßten aber in der tiefen Allgemeinnarkose des Organismus Veränderungen im Gesamtstoffwechsel entsprechen, die sich als Störungen der Oxydationsfähigkeit deuten lassen.

Als Stigmata einer solchen hat man anzusehen: Sinken der Sauerstoffaufnahme, Sinken der Körpertemperatur, Sinken der Blutalkalescenz, Steigerung des Eiweißzerfalls, Auftreten der Acetonkörper im Urin und Glucosurie als Folge einer Hyperglykämie.

Prüft man nun die in der Literatur vorhandenen Versuchsergebnisse des gesamten Stoffwechsels in der Narkose (diese finden sich durch O. Loewi in Noordens Handbuch zusammengestellt und kritisiert), so zeigt sich, daß die obengenannten Erscheinungen zwar regelmäßig als Folge einzelner Narkotica auftreten, daß es sich aber keineswegs um eine für alle Nar-

¹⁾ Münch. med. Wochenschr. 1910, Nr. 27.

kotika gemeinsame und also charakteristische Folgeerscheinung handelt. Eine solche charakteristische Folgeerscheinung aller Narkotica ist vielmehr nur ein Herabgehen von CO_2 -Abgabe und O_2 -Aufnahme und Sinken der Körpertemperatur, und Loewi ist deshalb auch geneigt, die Wirkung der Narkotica im allgemeinen nur in einer Herabsetzung des Bedürfnisses nach O_2 und nicht einer Hemmung der Fähigkeit, O_2 aufzunehmen, zu sehen. Bei denjenigen Narkotica aber, durch deren Wirkung auf den Organismus die Erscheinungen der gestörten Oxydation auftreten, nimmt er einmal eine spezifisch chemisch-toxische Wirkung (Chloroform, Chloral), ein andermal eine zufällige Nebenwirkung an: bei Äther, Morphinum und Aceton Asphyxie durch Verlangsamung der Atmung und sekundäre Oxydationshemmung durch verminderte Sauerstoffventilation.

In letzter Zeit hat nun Oppermann¹⁾ die oben erörterte Frage wieder aufgerollt und durch eine Reihe von Tierexperimenten Klarheit zunächst über die Wirkung der Narkose auf den Kohlenhydratstoffwechsel gebracht und von diesem aus Schlüsse auf den Allgemeinstoffwechsel gezogen. Er konnte einerseits für die Morphinumglucosurie Asphyxie als Ursache ausschließen, da es ihm gelang, durch Morphinumdosen, die die Atmung noch nicht beeinflussen, eine typische Hyperglykämie zu erzeugen. Andererseits wies er während der Morphinum-narkose eine direkte Behinderung der Dextroseverwertung nach. In zweiter Linie konnte er für Chloroform, Chloralhydrat, Äther und große Dosen Urethan, für die Zeichen der gestörten Oxydation bereits in der Literatur angegeben sind, auch eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels nachweisen, die sich diesen Zeichen auch im Entstehen und Vergehen analog verhielt. Für Veronal, Trional und kleine Dosen Alkohol, die den Allgemeinstoffwechsel nicht im Sinne der Oxydationshemmung beeinflussen, fand er dagegen eine Hypoglykämie. Er schloß deshalb für die Narkotica im allgemeinen, „daß sie in gewisser geringer Konzentration zunächst eine Hypoglykämie erzeugen, während die Hyperglykämie den Gipfelpunkt ihrer Wirkung, die Allgemeinnarkose, darstellt, der von den Hypnotica infolge ihrer

¹⁾ Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilkunde 47/48, 590.

schlechten Resorbierbarkeit und ihrer elektiven Bindung an das Zentralnervensystem kaum oder nicht erreicht wird“, und daß die Hyperglykämie das Zeichen der eingetretenen direkten Hemmung der Oxydation darstellt. Hieraus läßt sich folgern, daß es gelingen muß, für ein und dasselbe Narkoticum in geringer, hypnotisch wirkender Dosis eine Hypoglykämie, in hoher, allgemein-narkotisch wirkender Dosis eine Hyperglykämie nebst den übrigen Zeichen gestörter Oxydationsfähigkeit der Gewebe nachzuweisen.

Dies ist für den Alkohol bereits von Oppermann versucht worden. In einem Versuche mit 3 ccm absol. Alkohol pro Kilogramm Tier erzielte er eine Hypoglykämie, in einem zweiten mit 5 ccm pro Kilogramm eine geringe und deswegen, wie er angibt, nicht beweiskräftige Hyperglykämie. In einem dritten von ihm angestellten (nicht veröffentlichten) Versuche mit 10 ccm absol. Alkohol pro Kilogramm Tier erzielte er zwar eine deutliche Hyperglykämie, allein die Beweiskraft dieses Versuches scheiterte an den schweren toxischen Schädigungen (Gastroenteritis haemorrhagica), die die Einwirkung derartiger Mengen absoluten Alkohols auf den tierischen Organismus hervorruft.

So sind zwar die Schlüsse Oppermanns durch die Gesamtheit der Befunde sehr wahrscheinlich gemacht, jedoch ist ein strikter Beweis noch nicht vorhanden.

Da nun der Alkohol sich zu diesem Beweise nicht eignet, so war ein Mittel zu suchen, das in geringen Dosen hypnotisch, in stärkeren narkotisch wirkt, ohne dabei doch toxische Nebenwirkungen hervorzubringen.

Ein solches Mittel ist der Paraldehyd. Cervello¹⁾, der als erster die Allgemeinwirkung des Paraldehyds auf den Organismus experimentell am Tier durchgeprüft hat, berichtet, daß er in kleinen Dosen ruhigen Schlaf erzeugt, in stärkeren Narkose, und daß der Wirkung im Gegensatz zum Chloralhydrat kein Aufregungsstadium vorangehe. Die Wirkung auf die Atmungsfrequenz fand Cervello sehr gering. Selbst bei tiefer Narkose fand er gegenüber der normalen Zahl der Atemzüge „höchstens Differenzen, wie sie auch im physiologischen Schlafe bemerkbar werden“. Auch Herz und Blutdruck werden sehr wenig beeinflußt: „Die Frequenz der Herzschläge und die Energie der Contractionen nehmen unter der Einwirkung von Paraldehyd auch bei sehr großen Dosen nicht merklich ab,

¹⁾ Arch. f. Pathol. u. Ther. 16.

ebensowenig verändert sich der Blutdruck. Auch ist die therapeutische Wirkungsbreite sehr groß, und erst in gar zu hohen Dosen erfolgt der Tod durch Beeinträchtigung der Respiration.“ Über die Dosierung des Paraldehyds hat Bumke¹⁾ für den Menschen die Angaben gemacht, daß die geringste wirksame Dosis 3 g ist, doch werden auch 20 bis 24 g täglich für längere Zeit und für kurze Zeit 60 g täglich anstandslos vertragen. Auch 100 g, versehentlich genommen, riefen keine besonderen Erscheinungen hervor.

Der Paraldehyd war bereits von den Schülern Chittedens in seiner Wirkung auf den Stoffwechsel untersucht worden. Was den Allgemeinstoffwechsel betrifft, so fanden Bokai und Dockendorff²⁾ die Diuresis nach Paraldehyd in geringem Grade gesteigert. Der Eiweißstoffwechsel wurde von Dockendorff³⁾ geprüft. Dieser fand, daß nach 18tägiger Einnahme von durchschnittlich täglich 2,1 g Paraldehyd — das wäre für einen Hund mittlerer Größe ca. 0,3 g pro Kilogramm täglich — die N-Ausscheidung täglich um 0,38 g sank, daß sie jedoch nach Aussetzen des Mittels um weitere 0,158 g herunterging. Dockendorff kommt zu dem Schluß, „daß der Paraldehyd keinen spezifischen Einfluß auf den Eiweißumsatz ausgeübt hat“.

Wollte ich nun mit diesem Narkoticum die oben erwähnten Sätze Oppermanns auf ihre Richtigkeit prüfen, so war zunächst der Einfluß von hohen, Narkose erzeugenden, und von geringen, Schlaf erzeugenden Dosen des Paraldehyds auf den Kohlenhydratstoffwechsel experimentell zu erforschen. Zur Beobachtung dieses Einflusses habe ich Tierversuche mit Blutzuckerreihenbestimmungen angestellt, die ja einen klaren Einblick in den zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Vergiftungssymptome einerseits und der Kohlenhydratstoffwechselveränderung andererseits gestatten.

Als Versuchstiere wurden ausschließlich Hunde genommen, die ja nach Oppler und Rona⁴⁾ und nach Rolly und Oppermann⁵⁾ im Gegensatz zu anderen Tieren bei Reihenblutentnahmen annähernd kon-

¹⁾ Zitiert nach Schmiedeberg: Pharmakologie.

²⁾ Centralbl. f. med. Wiss. 1887, 412.

³⁾ Zeitschr. f. Biol., Neue Folge Bd. 7.

⁴⁾ Diese Zeitschr. 13, 121 bis 131.

⁵⁾ Das Verhalten des Blutzuckers bei Gesunden und Kranken. Diese Zeitschr. 49.

stante Blutzuckerwerte ergeben. Immerhin wurde während sämtlicher Versuche darauf gesehen, daß eine psychische Alteration der Tiere nicht eintrat, was sich bei der Geringfügigkeit der notwendigen Eingriffe durch rasches und sorgsames Arbeiten bei Hunden leicht erreichen läßt.

Die Ausführung der Blutentnahme gestaltete sich so, daß die Tiere auf den Tisch gehoben und an den Extremitäten festgeschnallt wurden. An der Brust wurden sie außerdem vom Diener gehalten. Die Blutentnahme selbst wurde so ausgeführt, daß unterhalb der Leistenbeuge die Arteria femoralis in einer Ausdehnung von ca. 5 cm freigelegt und abgebunden wurde. Dicht oberhalb der Abbindungsstelle wurden aus einem kleinen Einschnitte ca. 15 bis 20 ccm Blut in feinem Strahl direkt über einer geringen Menge Fluornatrium aufgefangen. Nach abermaliger Abbindung oberhalb des Einschnittes wurde für die Zwischenzeit zwischen zwei Blutentnahmen die Wunde stets durch Klammern oder Nähte geschlossen, die Tiere entfesselt und in konstant warmem Raume sich selbst überlassen. Irgendwelche nachteiligen Folgen des Abbindens dieser großen Arterie sind nie aufgetreten wegen der viel reicheren Anastomosenbildung beim Tier gegenüber dem Menschen. Das Blut wurde nach der von Rolly und Oppermann¹⁾ angegebenen Weise nach Michaelis und Rona enteiweißt und nach der Bertrandschen²⁾ Methode bestimmt. Zugleich wurde bei jeder Blutentnahme die Temperatur (rektal) gemessen.

Im einzelnen gestalteten sich die Versuche folgendermaßen:

Versuch 1.

Datum: 22. VIII. 1913.

Versuchstier: Junger, männlicher Pintscher, 6,5 kg schwer, seit 16 Stunden hungernd.

1⁴⁵ I. Blutentnahme. T. 37,7°.

1⁵⁸ 15 g Paraldehyd (= 2,3 g pro Kilogramm) + ca. 20 g Gummilösung per os. Kein Erbrechen. Sofortige Narkose. Leichtes Zittern der hinteren Extremitäten.

4¹⁰ II. Blutentnahme. T. 34,5°. Keine Schmerzäußerung, absolute Unbesinnlichkeit.

¹⁾ l. c.

²⁾ Siehe Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden II.

7³⁰ III. Blutentnahme. T. 31,5°. Wie bei II.

11³⁰ nachts: Leichtes Stöhnen. Schnarcht.

12⁴⁰ " Einzelne Kopfbewegungen, hört jedoch nicht auf Anruf.

1¹⁰ nachts: IV. Blutentnahme. T. 36,1°. Atemzüge von Stöhnen begleitet; keine Reaktion auf Schmerz.

11³⁰ mittags am andern Tage wieder normal. T. 37,5°.

Der 11³⁰ vorgefundene Harn zeigte Fehling +, Trommer +, Nylander +.

Die Bestimmungen des Plasmazuckers ergaben für

I 0,123 ‰,	III 0,144 ‰,
II 0,258 ‰,	IV 0,110 ‰.

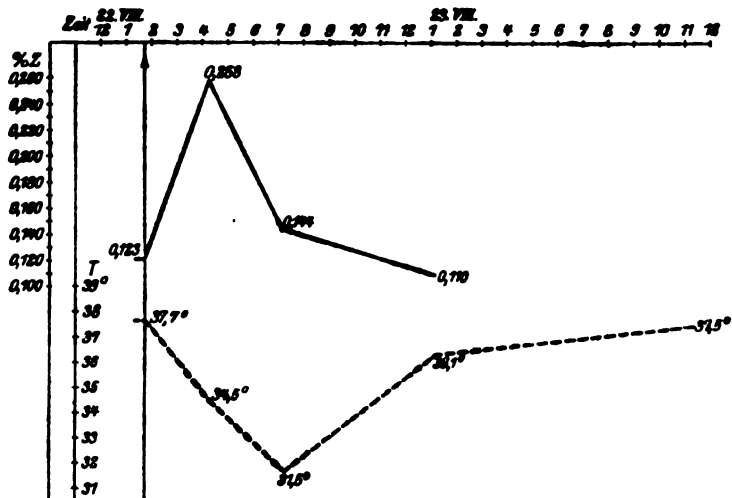


Fig. 1.

Dieser Versuch zeigt zunächst, daß 2 Stunden nach Einnahme dieser hohen Dosis Paraldehyd es zugleich mit einer schweren Narkose zu einer beträchtlichen Steigerung des Blutzuckers gekommen ist, die nach weiteren 4 Stunden bereits im Abklingen begriffen ist, während nach weiteren 5 Stunden, wo auch deutliche Zeichen des zurückkehrenden Bewußtseins vorhanden sind, der Blutzucker etwas unter den Anfangswert gesunken ist. In bemerkenswertem Einklang zu dem oben Erwähnten steht das Verhalten der Temperatur, die mit dem Eintreten der Paraldehydwirkung stark sinkt und beim Zurück-

kehren zum Normalzustand ebenfalls ihre alte Höhe wieder erreicht. Daß zwischen den Blutentnahmen II und III die Temperaturerscheinungen noch zunehmen, während die Hyperglykämie bereits wieder im Abklingen begriffen ist, ist verständlich, wenn man bedenkt, daß, wie das Verhalten des Blutzuckers zeigt, die Oxydationshemmung bereits wieder zurückgehen kann, während nun die spezifisch großhirnlähmende Wirkung des Paraldehyds allein zur Wirkung kommt, die ja in einer Hinderung der Wärmeregulation durch herabgesetzte Produktion von Brennmaterial besteht. Zugleich ist das Verhalten der Temperatur ein Beweis dafür, daß in diesem Falle die Hypothermie, die ja, wie man weiß, an sich zu einer Steigerung des Blutzuckers führen kann, nicht als Ursache der Hyperglykämie angesehen werden kann, da das Sinken der Temperatur noch andauert, während die Hyperglykämie wieder im Abfallen begriffen ist. Trotzdem war ich im nächsten Versuche bestrebt, die starke Abkühlung zu vermeiden und versuchte durch Einwickeln in Tücher und durch in die Nähe gebrachte elektrische Glühlampen den Hund davor zu schützen. Es wurde wesentlich weniger des Mittels gegeben.

Versuch 2.

Datum: 24. VIII. 1913.

Versuchshund: Weiblicher Dobermann, 1 Jahr alt, 16 Stunden hungernd.

11⁴⁵ I. Blutentnahme. T. 39,5°.

12⁰⁰ 15 g Paraldehyd (= 1 g pro Kilogramm) + ca. 10 g Gummilösung per os. Kein Erbrechen.

12⁴⁵ Leichtes Taumeln. Stößt sich oft an Gegenständen im Zimmer. Zunehmendes Taumeln, dann Schläfrigkeit.

12⁴⁵ Hund liegt am Boden, hebt auf Anruf nur leicht den Kopf, ist nicht mehr fähig aufzustehen. Wird in Tücher gewickelt und in die Nähe elektrischer Glühbirnen gebracht. So bleibt er während des ganzen Versuches.

1²⁵ Starker Speichelfluß. Absolut interesselos daliegend. Reaktion auf Geräusch und Schmerz noch vorhanden, doch stark abgeschwächt II. Blutentnahme. T. 40,2°.

3⁵⁵ III. Blutentnahme. T. 40,1°. Tief im Schlaf, bemerkt nicht, daß er auf den Tisch gehoben wird.

4⁵⁰ Schlaf.

5⁴⁵ Kann sich schon wieder aufrichten. Macht noch unorientierten Eindruck. Absolute Parese der hinteren Extremitäten. Reagiert auf Schmerz und Liebkosung.

5⁵⁰ IV. Blutentnahme. T. 40,0°.

8¹⁰ V. Blutentnahme. T. 39,6°. Bei der Entnahme ruhig, kann sich mit leichter Ataxie fortbewegen.

Die Bestimmungen des Plasmazuckers ergaben für

I 0,093 ‰,	IV 0,118 ‰,
II 0,125 ‰,	V 0,106 ‰.
III 0,133 ‰,	

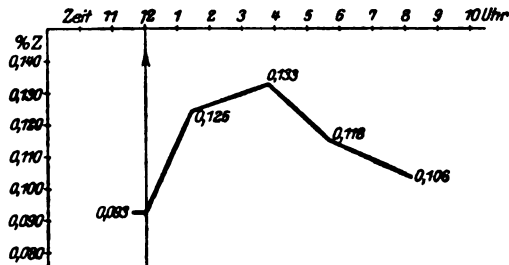


Fig. 2.

Auch bei diesem Versuche kam es unter Ausschaltung der Abkühlung zu einer Steigerung des Blutzuckers. Es wurde bei diesem Versuche gar kein Abfall der Temperatur beobachtet, sondern sogar ein kleiner Anstieg, der indes zu gering ist, um als solcher irgendwie für den Blutzuckerspiegel von Bedeutung zu sein. Bekanntlich ist durch starke künstliche Hyperthermie eine nur geringe Steigerung des Blutzuckers zu erzielen. Entsprechend der geringeren Konzentration des Mittels bei diesem Versuche ist auch die Blutzuckersteigerung nicht so beträchtlich wie das erste Mal, auch wird der Höhepunkt langsamer erreicht. Blutentnahme II und III zeigen den Stand der Kohlenhydratverbrennung auf der Höhe der Wirkung, bei IV sind die Erscheinungen schon etwas und bei V fast ganz zurückgegangen.

Es wurde nun noch ein Versuch mit geringen Mengen Paraldehyd angeschlossen.

Versuch 3.

Datum: 27. VIII. 1913.

Versuchstier: Kleiner brauner Hund „Peter“, 7 kg schwer,
14 Stunden hungernd.

12¹⁸ I. Blutentnahme. T. 38,9°.

12⁴⁸ 3 g Paraldehyd (= 0,43 g pro Kilogramm) + 1 g
Gummilösung per os.

12⁵⁸ Taumelt.

1¹⁰ Beginnt zu schlafen.

1³⁰ Ruhiger Schlaf, keine Narkose.

Reagiert auf Anruf noch ein wenig.

1³⁵ II. Blutentnahme. T. 38,8°.

2⁵⁰ III. Blutentnahme. T. 38,5°. Reagiert etwas stärker
als bei II.

5⁰⁰ IV. Blutentnahme. T. 39,2°. Wieder fast normal.

Die Bestimmungen des Plasmazuckers ergaben für

I 0,127 ‰,	III 0,091 ‰,
II 0,104 ‰,	IV 0,118 ‰.

Unter der Einwirkung einer geringen Menge Paraldehyd kam es demnach zu einem Absinken des Blutzuckers, das wieder auf der Höhe der Erscheinungen sein Maximum erreichte, um mit dem Abklingen der Erscheinungen zum ursprünglichen Werte zurückzu-

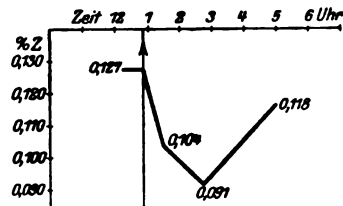


Fig. 3.

kehren. Dabei zeigt sich ein gewisser Parallelismus zwischen der jeweiligen Höhe des Zuckerspiegels und der wirksamen Konzentration des Mittels. Wieso es zum Absinken des Blutzuckers kommt, ist noch nicht ganz klar. Sicherlich ist es nicht der Ausdruck gesteigerter Oxydation. Nach Oppermanns Ansicht könnte es sich um Hemmung der Glykogenmobilisation der Leber oder sogar um gesteigerte Glykogenbildung auf Kosten des Blutzuckers handeln. Das Verhalten der Temperatur läßt sich auch in dieser Weise erklären: die geringe Senkung entspricht der des physiologischen Schlafes.

Fassen wir nun die Ergebnisse der 3 Versuche zusammen, so können wir sagen: Der Paraldehyd beeinflusst die

Höhe des Blutzuckers nach Maßgabe seiner Dosis: nach geringen Mengen tritt Hypoglykämie, nach mittleren Dosen eine mäßig starke Hyperglykämie, nach starken Gaben eine starke Hyperglykämie auf. Diese Beeinflussung des Blutzuckers schien direkt abhängig von der wirksamen Anwesenheit des Mittels im Organismus.

Dieser Störung der Kohlenhydratverwertung nach großen Dosen Paraldehyd müßten nun auch im Gesamtstoffwechsel die anderen Erscheinungen der gestörten Oxydation entsprechen. Das Verhalten der Temperatur ist bereits in Betracht gezogen worden; daß der Paraldehyd den respiratorischen Quotienten herabsetzt, ist bereits aus der Literatur bekannt (Loewi in Noordens Handbuch).

In einer zweiten Versuchsreihe ist deswegen die Wirkung des Paraldehyds auf den Eiweißumsatz untersucht worden. Wie schon erwähnt, hatte Dockendorff keinen spezifischen Einfluß des Paraldehyds auf den Eiweißstoffwechsel gesehen.

Zu Eiweißstoffwechselversuchen habe ich nur Hungerversuche angestellt, da die über 24 Stunden hinausreichenden Narkosen die Anstellung von Stickstoffgleichgewichtsversuchen (mit Fütterung) nicht erlauben.

Ich ging deswegen folgendermaßen vor: Ich ließ einen Hund hungern und gab ihm täglich möglichst die gleiche Menge Wasser. Die Harnmenge von genau 24 stündigen Perioden, die stets durch Katheterisieren abgeschlossen wurden, wurde gemessen und der N-Gehalt nach der Kjeldahlschen Methode bestimmt. Sobald der Hund mindestens 3 Tage hindurch täglich die gleiche Menge N ausschied, begann ich mit der Eingabe von Paraldehyd. Der Kot wurde stets für die ganze Periode gesammelt und sein N-Gehalt entsprechend den üblichen Methoden bestimmt.

Versuch 4.

Tabelle I.

Perioden vom	Einnahmen ccm	Ausgaben				Bemerkungen	
		Harn			Kot		
		Menge	Spez. Gew.	N	Menge		N
15.—16.	ca. 160	172	1029	2,528	}8,716 }0,428	Wiegt 8550 g	
16.—17.	" 150	127	1029	2,510			
17.—18.	" 150	136	1027	2,455			

Tabelle I (Fortsetzung).

Perioden vom	Einnahmen ccm	Ausgaben				Bemerkungen
		Harn		Kot		
		Menge	Spez. Gew.	N	Menge	
18.—19.	ca. 180	170	1039	2,950	}3,099 }0,147	20 g Paraldehyd + 25 ccm Wasser. Fehling + Nylander + 18 g Paraldehyd + ca. 60 ccm Wasser zum Spülen des Mittels
19.—20.	" 160	105	1040	3,329		
20.—21.	" 150	285	1019	4,198		
21.—22.	ca. 150	122	1029	2,117		Schwellung des Fußes. T. 40,3°.
22.—23.	" 130	110	1029	2,248		
23.—24.	" 130	110	1037	2,487		

Zusammenstellung (I).

	Gesamt-N-Ausscheidung g	Tägl. durchschnittl. N-Ausscheidung g
Vorperiode . .	7,915	2,638
Hauptperiode .	10,624	3,541
Nachperiode .	6,852	2,284

Es zeigt sich also, daß die großen Dosen Paraldehyd die N-Ausscheidung, also den Eiweißumsatz, erhöht haben. Während der Hund an 3 Hungertagen zusammen 7,915 g N ausschied, stieg die Stickstoffausscheidung während 3 Tagen, an denen er unter der Einwirkung von Paraldehyd stand, auf 10,624 g. Im einzelnen ist zu diesem Versuche zu bemerken: Die Narkose, die am 18. mit 20 g Paraldehyd erzeugt wurde, entsprach einer Konzentration von ca. 2 g pro Kilogramm Gewicht. Während dieser Narkose sank die Temperatur von 38,9° zu Beginn des Versuches auf 36,3°, 34,6°, 32,6°. Dieses Temperaturminimum wurde nach 6 Stunden erreicht. Während dieser Zeit war der Hund völlig bewußtlos, dann stieg die Temperatur wieder zur alten Höhe an. Die 13 g Paraldehyd der zweiten Narkose am 20. entsprachen 1,5 g pro Kilogramm. Auch hierbei sank die Temperatur im Verlaufe von 4 Stunden von 38,9° auf 36,5°, um dann wieder anzusteigen. Es zeigt sich nun auch an dem paraldehydfreien Tage (19) zwischen den beiden Narkosetagen die N-Ausscheidung vermehrt. Dies ist unschwer zu erklären, denn Cervello (l. c.) gibt ausdrück-

lich an, daß das Paraldehyd zwar rasch resorbiert, aber ziemlich langsam wieder ausgeschieden wird. Ferner weist er darauf hin, daß leicht eine Gewöhnung eintritt. Somit muß man annehmen, daß auch an dem Zwischentage der Organismus noch unter der Einwirkung des Paraldehyds stand. Der am letzten Tage der Nachperiode eintretende geringe Anstieg des Stickstoffs findet wohl in der Schwellung am Bein und dem Fieber seine Erklärung.

Es mag nun gleich ein zweiter Versuch hier angeführt werden, der genau in der gleichen Weise wie der vorige an- gestellt wurde.

Versuch 5.
Tabelle II.

Perioden vom	Einnahmen ccm	Ausgaben					Bemerkungen
		Harn			Kot		
		Menge	Spez. Gew.	N	Menge	N	
12.—13.	ca. 200	215	1014	2,222	} nicht ge- wogen	} 0,284	Die 4 vorausgehenden Perioden sind nicht angeführt. Wiegt 6800 g
13.—14.	" 200	95	1027	2,233			
14.—15.	" 200	147	1016	2,276			
15.—16.	ca. 200	185	1018	2,463			
16.—17.	" 200	300	1020	3,790			7 g Paraldehyd + ca. 100 ccm Wasser.
17.—18.	" 200	235	1017	4,198			8 g Paraldehyd + ca. 100 ccm Wasser
18.—19.	ca. 200	175	1022	2,590	} nicht ge- wogen	} 0,10	
19.—20.	" 200	300	1009	2,465			

Der Versuch mußte aus äußeren Gründen abgebrochen werden. Da jedoch die beiden Tage der Nachperiode ziemlich genau untereinander übereinstimmen, so sei es mir erlaubt, den Mittelwert zwischen beiden als dritten Wert hinzuzufügen, um so je 3 Tage der Vor-, Haupt- und Nachperiode miteinander vergleichen zu können.

Zusammenstellung (II).

	Gesamt- N-Ausscheidung	Tägl. durchschnittl. N-Ausscheidung
	g	g
Vorperiode . .	7,015	2,338
Hauptperiode .	10,451	3,483
Nachperiode .	7,682	2,841

Auch in diesem Versuche erfährt die N-Ausscheidung unter dem Einfluß des Paraldehyds wie im vorigen Versuche eine deutliche Vermehrung. In den 3 Tagen der Hauptperiode wurden 3,436 g N mehr ausgeschieden, als in den 3 Tagen der Vorperiode, und das tägliche Plus beträgt an den 3 Paraldehydtagen 1,145 g N.

Hiermit ist bewiesen, daß der Paraldehyd in nar-
kotisch wirkenden Dosen den Eiweißumsatz erhöht.

Dieses Verhalten der N-Ausscheidung könnte man natür-
lich erst dann als eine dem Verhalten des Blutzuckers koordi-
nierte Erscheinung erklären, wenn sich nachweisen ließe, daß
er in kleinen Dosen ohne Einfluß auf den Eiweißumsatz ist oder
sogar eiweißsparend wirkt. Dockendorff hatte ja bei seinen
Versuchen mit kleinen Mengen Paraldehyd eine sehr geringe
Verminderung der N-Ausscheidung gefunden. Immerhin glaubte
ich diese Verhältnisse nachprüfen zu müssen.

Die Hunde wurden bei den folgenden Versuchen durch
die geringen Mengen zwar zum Schlaf gebracht, reagierten je-
doch die ganze Zeit über auf Anruf. Auch die Temperatur
sank auf der Höhe der Wirkung nur um einige Zehntel Grade.

Versuch 6.

Junge weibliche Dogge „W“, ca. 1½ Jahr alt, bereits
einige Tage hungernd.

Tabelle III.

Perioden vom	Einnahmen	Ausgaben				Bemerkungen
		Harn			Kot	
		Menge	Spez. Gew.	N	Menge u. N	
20.—21.	ca. 200 ccm Wasser	165	1015	2,212	—	
22.—23.	do.	160	1017	2,231	—	
23.—24.	do.	183	1015	2,211	—	
24.—25.	do.	} 317	1019	4,360	—	= 2,18 g N pro Tag.
25.—26.	do.					
26.—27.	do. + Spülwasser	360	1010	2,336	—	{ ^{12³⁰} 5 ⁰⁰ 8 ³⁰ } je 1,5 g Paraldehyd.
27.—28.	do. + Spülwasser	196	1012	1,976	—	{ ^{12³⁰} 4 ⁰⁰ } je 1,0 g Paraldehyd.
28.—29.	do. + Spülwasser	136	1017	1,906	—	{ ^{12³⁰} 5 ⁰⁰ 8 ⁰⁰ } je 0,5 g Paraldehyd.

Versuch 7.

Junger schwarzer Pintscher „Scharf“, ca. 1 $\frac{1}{2}$ Jahr alt.

Tabelle IV.

Perioden vom	Einnahmen	Ausgaben				Bemerkungen
		Harn			Kot	
		Menge	Spez. Gew.	N	Menge u. N	
22.—23.	ca. 200 ccm Wasser	150	1014	1,912	—	
23.—24.	do.	171	1014	1,868	—	
24.—25.	do.	150	1013	1,896	—	
25.—26.	do.	176	1014	1,744	—	
26.—27.	do. + Spülwasser	285	1012	2,062	—	{ 12 ⁴⁰ 4 ³⁰ 8 ³⁰ } je 1,5 g Paraldehyd.
27.—28.	do. + Spülwasser	200	1013	2,078	—	{ 12 ³⁰ 4 ⁰⁰ } je 1,0 g Paraldehyd.
28.—29.	do. + Spülwasser	138	1016	1,976	—	{ 12 ³⁰ 5 ⁰⁰ 8 ⁰⁰ } je 0,5 g Paraldehyd.

Aus diesen beiden letzten Versuchen geht in Bestätigung der Dockendorffschen Befunde hervor, daß der Paraldehyd in geringen Mengen keinen deutlichen Einfluß auf den Eiweißstoffwechsel ausübt.

Also ist die Steigerung des Eiweißzerfalls nur für hohe, Allgemeinnarkose bewirkende Dosen charakteristisch. Nur für solche ist aber auch die starke Herabsetzung der Temperatur und die Hyperglykämie beobachtet worden. Also kann man wohl alle drei Erscheinungen als Folgen ein und derselben Ursache, nämlich einer Störung der Oxydationsfähigkeit durch die Paraldehyd-Allgemeinnarkose ansehen, und die Richtigkeit der oben erwähnten Schlüsse Oppermanns wäre dadurch bewiesen, daß nämlich die Allgemeinnarkose des Organismus in der Tat in einer Störung der Oxydationsfähigkeit der Gewebe ihren Ausdruck findet.

Zusammenfassung.

1. Der Paraldehyd ruft bei Hunden in geringen, Schlafmachenden Dosen eine leichte Herabsetzung des Blutzuckerspiegels, in hohen, Allgemeinnarkose hervorrufenden Dosen eine erhebliche Steigerung des Blutzuckers und dadurch eventuell Glucosurie hervor.

2. Geringe, Schlaf machende Dosen des Mittels haben keinen Einfluß auf den Eiweißumsatz, große, narkotisch wirkende Dosen erhöhen denselben.

3. Hohe Dosen rufen neben der Hyperglykämie und der Steigerung des Eiweißzerfalls auch ein starkes Sinken der Körpertemperatur, sowie eine Herabsetzung des respiratorischen Quotienten hervor. Es läßt sich also auf eine in der Paraldehyd-Allgemeinnarkose vorhandene Störung der Oxydation schließen.

4. Entsprechend den Befunden Oppermanns bei anderen Narkotica bestätigt sich der Satz, daß die Narkotica in geringer, Schlaf machender Konzentration zunächst eine Hypoglykämie, auf dem Gipfelpunkte ihrer Wirkung, der Allgemeinnarkose, aber eine Hyperglykämie erzeugen, die den Ausdruck für eine direkte Herabsetzung der Oxydationsfähigkeit der Gewebe durch die Allgemeinnarkose als solche darstellt.

Diese Arbeit wurde im Laboratorium der Leipziger Medizinischen Klinik ausgeführt (Direktor Herr Geheimrat v. Strümpell). Ich möchte an dieser Stelle Gelegenheit nehmen, Herrn Geheimrat v. Strümpell für die gütige Überlassung des Materials, sowie Herrn Professor Rolly für die Anregung zu dieser Arbeit und die Gelegenheit zu ihrer Ausführung meinen ergebensten Dank auszusprechen. Ebenso möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Oppermann für die große Liebenswürdigkeit, mit der er mich in die Versuchsmethodik einführte, meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Ammonnitrat und freie Salpetersäure als Stickstoffquelle für Schimmelpilze.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

G. E. Ritter.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des Instituts für Land- und Forstwirtschaft zu Nowo-Alexandria.)

(Eingegangen am 21. Februar 1914.)

Gelegentlich meiner Studien über die Verwertung des Ammoniaks und der Nitate durch Schimmelpilze¹⁾ stellte ich auch einige Versuche mit *Aspergillus niger* auf Zucker-Ammonnitratlösungen an. Einige dabei beobachtete Tatsachen führten mich zur Annahme, daß unter Umständen auch freie Salpetersäure als Stickstoffquelle für *Aspergillus niger* dienen kann. Diese Annahme wurde im Herbst 1913 durch direkte Versuche geprüft und bestätigt. Einen kurzen Bericht über diese Versuche möchte ich hier geben²⁾; als Einführung möchte ich aber zunächst die oben erwähnten, vor 2¹/₂ Jahren angestellten Versuche über die Verwertung des Ammonnitrats durch *Aspergillus niger* vorausschicken.

Den Ausgangspunkt für meine Versuche bildete die Beobachtung von Butkewitsch³⁾, daß *Aspergillus niger* aus 1⁰/₁₀igem Ammonnitrat durch energische Ammoniakaufnahme größere Mengen von Salpetersäure freimacht. Es stellte sich nun bei weiterer Untersuchung dieser Tatsache bald heraus, daß diese Säureansammlung einen verschiedenen Verlauf nimmt, je nachdem in welcher Konzentration das Ammonnitrat in die Nährlösung eingeführt wird.

¹⁾ G. E. Ritter, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 27, 582, 1909; 29, 571, 1911.

²⁾ Eine ausführliche Mitteilung (in russischer Sprache) ist bereits an die Redaktion einer Festschrift abgesandt, die in Moskau im Laufe dieses Jahres erscheinen soll. — Zu der vorliegenden vorläufigen Mitteilung veranlaßt mich zum Teil die mir soeben zu Gesicht gekommene, in dieser Zeitschr. 59, 63, 1914 erschienene Arbeit von Wehmer, mit der die meinige einige Berührungspunkte aufweist.

³⁾ Jahrb. f. wiss. Botan. 38, 212, 1902.

Meine Versuche wurden (wie früher) auf 50 ccm Nährlösung im 200-ccm-Erlenmeyer-Kolben angestellt, die folgende Zusammensetzung hatte: Rohrzucker 10⁰/₀, KH_2PO_4 0,1⁰/₀ und MgSO_4 0,05⁰/₀; Ammonnitrat 0,4, 0,8 oder 1,6⁰/₀. Die Kulturen wurden im Thermostaten bei 29 bis 32° gehalten und nach 2, 4 und 8 Tagen (manchmal auch nach 12 Tagen) untersucht.

Das Pilzmycel wurde von der Kulturflüssigkeit auf dem Filter abgeteilt, sorgfältig gewaschen und darauf bei 105° getrocknet. Das Waschwasser wurde mit der Kulturflüssigkeit vereinigt und auf 200 ccm aufgefüllt. Davon wurden je 50 ccm zur Bestimmung des Ammoniakstickstoffs (durch Destillation mit Magnesia), des Nitratstickstoffs (durch Reduktion zu NH_3 mit Zn und Fe) und der Acidität verwandt. Aus der Differenz zwischen dem Nitrat- und Ammoniakstickstoff konnte der N der freien HNO_3 und folglich die Menge der letzteren direkt bestimmt werden. Die Acidität wurde durch Titrieren mit ¹/₁₀-Ammoniak oder Natronlauge bestimmt. Als Indicator benutzte ich, wie schon früher (Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 27, 570, 1909) Methylorange, das bei einiger Übung, besonders bei einer Reihe von parallellaufenden Bestimmungen, sehr genaue Resultate liefert, und für die Titration von starken Säuren eigentlich der einzige empfehlenswerte Indicator ist. Da es mir darauf ankam, die Acidität mit der direkt bestimmten HNO_3 -Menge zu vergleichen, wurde erstere in Kubikzentimeter einer ⁿ/₁₀-Lösung ausgedrückt und letztere ebenfalls in die entsprechenden Zahlen umgerechnet.

Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in den folgenden vier Tabellen zusammengestellt.

Tabelle I.

Aspergillus niger. Kultur 12. V. bis 20. V. 1911. Nährlösung: Rohrzucker 10⁰/₀, NH_4NO_3 ca. 0,4⁰/₀, KH_2PO_4 0,1⁰/₀, MgSO_4 0,05⁰/₀, $t = 29^\circ$. — Je 50 ccm Nährlösung im 200-ccm-Erlenmeyer-Kolben; Stickstoffgehalt 73,2 mg in 50 ccm.

Versuchsdauer Tage	Trockengewicht des Mycels g	N in der Kulturflüssigkeit		Freie HNO_3 daraus berechnet ccm ⁿ / ₁₀	Acidität ccm ⁿ / ₁₀
		Ammon-N mg	Nitrat-N mg		
2	0,630	2,7	28,2	18,2	20,8
4	2,069	0,6	3,9	2,4	46,5 ¹⁾
8	1,734	0,8	2,4	1,1	4,9 ¹⁾

¹⁾ Oxalsäure vorhanden.

Tabelle II.

Aspergillus niger. Kultur 30. V. bis 11. VI. 1911. Nährlösung wie oben, nur NH_4NO_3 ca. 0,8%; $t=32^\circ$. Stickstoffgehalt 142,4 mg in 50 ccm.

Versuchsdauer Tage	Trockengewicht des Mycels g	N in der Kulturflüssigkeit		Freie HNO_3 daraus berechnet ccm %/10	Acidität ccm %/10
		Ammon-N mg	Nitrat-N mg		
2	0,779	25,1	66,2	29,3	29,2
4	1,331	2,2	63,6	43,8	44,3
8	1,387	1,7	65,0	45,2	45,3
12	1,331	6,5	65,5	42,1	43,2

Tabelle III.

Aspergillus niger. Kultur 14. V. bis 22. V. 1911. Nährlösung wie oben, NH_4NO_3 ca. 1,6%; $t=29^\circ$. Stickstoffgehalt: 293,2 mg in 50 ccm.

Versuchsdauer Tage	Trockengewicht des Mycels g	N in der Kulturflüssigkeit		Freie HNO_3 daraus berechnet ccm %/10	Acidität ccm %/10
		Ammon-N mg	Nitrat-N mg		
2	0,543	108,6	138,0	21,0	20,4
4	1,038	86,2	134,8	34,7	34,9
8	0,957	84,8	137,3	38,0	37,3

Aus diesen drei Tabellen kann auch die Menge des Ammoniak- und Nitratstickstoffs (also auch des Gesamtstickstoffs) berechnet werden, die vom Pilz während 2, 4 und 8 tägiger Kultur aufgenommen wird. (Eine direkte N-Bestimmung im Mycel wurde leider nicht ausgeführt.) Die Resultate dieser Berechnung sind in Tabelle IV angeführt.

Tabelle IV.

Nach Tagen	Konzentration des NH_4NO_3 in der Nährlösung:					
	0,42% (73,2 mg N in 50 ccm)		0,81% (142,4 mg N in 50 ccm)		1,68% (293,2 mg N in 50 ccm)	
	Verbraucht		Verbraucht		Verbraucht	
	Ammon-N mg	Nitrat-N mg	Ammon-N mg	Nitrat-N mg	Ammon-N mg	Nitrat-N mg
2	33,9	8,4	46,1	5,0	38,0	8,6
4	36,0	32,7	69,0	7,6	60,4	11,9
8	35,2	34,2	69,5	6,2	61,8	9,3

Aus den Zahlen der ersten drei Tabellen, welche die Menge der freien Salpetersäure angeben, läßt sich klar ersehen, daß dieselbe in den Kulturen mit 0,8 und 1,6⁰/₁₀ NH_4NO_3 schon nach 3 bis 4 Tagen infolge energischer NH_3 -Aufnahme seitens des Pilzes eine solche Konzentration erreicht, die eine weitere Entwicklung des Pilzes unmöglich macht. Wenn wir nämlich berücksichtigen, daß im Thermostaten das Flüssigkeitsvolumen durch Verdunstung bald abnimmt, so ergibt sich aus den angeführten Zahlen, daß die Konzentration der HNO_3 auf 0,8 und 1,6⁰/₁₀ige Ammonitratlösungen einer 0,1 normalen leicht nahekommt. Die Grenze für das Mycelwachstum liegt aber beträchtlich tiefer; selbst auf Raulinscher Lösung (wo wir eine größere Widerstandsfähigkeit erwarten können) bestimmt sie Kiesel gleich $\frac{1}{15}$, d. h. 0,066 n¹). Ganz anders verhält sich die Sache auf 0,4⁰/₁₀ NH_4NO_3 . Nach 2 Tagen ist hier die Konzentration der HNO_3 gleich $\frac{18,2}{500}$ oder ca. 0,04 n. Im weiteren Verlauf des Versuchs nimmt die Menge der freien HNO_3 rasch ab, um nach 8 Tagen auf ca. 0,002 n zu sinken. Daß die Salpetersäure dabei vom Pilz wirklich aufgenommen und als Stickstoffquelle verwertet wird, das geht nicht nur aus den Tabellen I und IV, sondern auch aus meinen weiter mitgeteilten Versuchen zweifellos hervor.

Aus der Tabelle I ersehen wir noch, wie ungenügend es ist, sich bloß auf eine titrimetrische Bestimmung der Acidität zu beschränken. Während nämlich bei höheren Ammonitratkonzentrationen nur Salpetersäure frei wird und die Aciditätsbestimmungen mit der direkten analytischen Bestimmung der freien HNO_3 gut übereinstimmen, tritt auf 0,4⁰/₁₀ NH_4NO_3 neben der HNO_3 noch freie Oxalsäure auf, und zwar dann, wenn die erstere schon stark zurückgegangen ist²).

¹) Kiesel, Annales de l'Inst. Pasteur 27, 397, 1913.

²) Wehmer hat in seinen ausgezeichneten Studien über die Oxalsäurebildung durch *Aspergillus niger* die Bildung freier Oxalsäure in Zucker-Ammonitratkulturen mehrfach festgestellt (Bot. Zeitg. 1891), doch weder in seiner ersten noch in seinen späteren Arbeiten analytische Belege für das gleichzeitige Auftreten von Oxal- und Salpetersäure geliefert. Vor kurzem (Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 31, 223, 1913) äußerte er sich anlässlich einiger titrimetrischer Bestimmungen der Gesamtacidität (mit Phenolphthalein!) in NH_4NO_3 -Kulturen von *Aspergillus* und *Penicillium*

Weiter fällt das sehr verschiedene Trockengewicht des Mycels bei verschiedenen Konzentrationen auf. Auf 0,4^o/_o NH₄NO₃ erreicht es den doppelten von dem auf 1,6 und den 1¹/₂fachen von dem auf 0,8^o/_o NH₄NO₃ erzielten Wert. Der Grund für dieses Zurückbleiben ist die schon oben erörterte rasche Zunahme der durch freie Salpetersäure bedingten Acidität, die auf die weitere Entwicklung des Pilzes hemmend einwirkt.

Wehmer hat schon in seiner ersten Arbeit (1891) ebenfalls verschiedene Konzentrationen von NH₄NO₃, nämlich 1,75^o/_o und 0,175^o/_o, angewandt, konnte aber außer einer etwas rascheren Entwicklung auf der 0,175^o/_oigen Lösung sonst keinen Einfluß auf das Trockengewicht und auf die Oxalsäurebildung finden. Er stellte eben seine Versuche bei niederer Zimmer-temperatur an; es ist sehr wohl möglich, daß das Studium des Temperatureinflusses noch weitere Einzelheiten in dieser Frage aufhellen wird.

Ich möchte diese Ausführungen noch mit der Bemerkung beschließen, daß die hier mitgeteilten Tatsachen jedenfalls die bis jetzt von verschiedenen Autoren gemachten Vergleiche zwischen dem Nährwert von (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl und NH₄NO₃ für *Aspergillus niger* als ziemlich bedeutungslos erscheinen lassen. Es wurde eben noch niemals der hier festgestellte Sachverhalt berücksichtigt, nach dem eine Veränderung der NH₄NO₃-Konzentration, und zwar eine Verminderung derselben, so unerwartet günstige Resultate ergeben kann¹⁾.

folgendermaßen: „Ob bei *Aspergillus* neben Oxalsäure auch freie Salpetersäure vorhanden ist, wäre einmal sicherzustellen.“ Meine obenstehenden analytischen Belege beweisen, daß ich mir diese Frage schon vor 2¹/₃ Jahren vorgelegt und zum Teil beantwortet habe. Sie verdient jedenfalls eine eingehendere Bearbeitung, die ich mir vorbehalten zu dürfen glaube. — In seiner letzten Mitteilung (diese Zeitschr. 59, 68, 1914) beschränkt sich Wehmer nur auf Aciditätsbestimmungen mit Kongo, Lackmus und Phenolphthalein. Die Abnahme der Acidität, die er dabei in sehr alten Kulturen beobachtete, beruht höchstwahrscheinlich auf einer Ansammlung von Ammoniak, das als Produkt der proteolytischen Zersetzung des Pilzmycels entsteht.

¹⁾ Butkewitsch, l. c. — Wehmer, diese Zeitschr. 59, 72, 1914. — Nikitinski, Jahrb. f. wiss. Botan. 40, 12, 1904. Von der Größe der in meiner Tabelle I angegebenen Ernte (2,07 g) erhält man einen richtigen Begriff durch den Vergleich mit den Angaben von Butkewitsch und

Indem ich mich nunmehr zu meinen Versuchen über die Aufnahme freier Salpetersäure durch die Schimmelpilze wende, möchte ich zunächst betonen, daß zu ihrer Ausführung mich außer den oben angeführten Beobachtungen noch der Gedanke führte, daß die Grenze zwischen Gift und Nährstoff sich manchmal verwischt und ganz unkenntlich wird. Als Beispiel sei die Weinsäure (und auch andere organische Säuren) angeführt. Für *Aspergillus niger* ist sie der reine Nährstoff und wird selbst in den höchsten Konzentrationen vertragen; gehen wir allmählich über *Penicillium glaucum* und *Rhizopus nigricans* zu den empfindlicheren *Mucoraceen* über, so sehen wir die Weinsäure schon in 0,3% Lösung hemmend wirken¹⁾, und für *Saprolegnia mixta* sind sogar 0,002 bis 0,005% Weinsäure entwicklungshemmend und tödlich²⁾.

Die Salpetersäure ist nun zwar auch für *Aspergillus niger* ein ziemlich starkes Gift, da ca. 0,45% ($\frac{1}{15}$ Mol) derselben die Sporenkeimung und Mycelentwicklung, und noch 0,21% die Konidienentwicklung in Raulinscher Lösung hemmen³⁾. Bietet man aber dem Pilz die Salpetersäure in geeigneter schwacher Konzentration, so erweist sie sich als ausgezeichnete Stickstoffquelle. Da in den von mir angewandten schwach konzentrierten Lösungen (0,015 bis 0,03 Mol HNO₃) die Salpetersäure dissoziiert war, so handelte es sich dabei eigentlich um die Aufnahme des Stickstoffs aus dem NO₃-Ion in Gegenwart von freien H-Ionen. Es scheint, daß diese

Nikitinski. Ersterer erhielt auf 100 ccm einer 10% Zucker + 1,21% NH₄NO₃-Lösung nur 1,84 g, und letzterer auf 50 ccm einer 32% Zucker + 1,5% NH₄NO₃-Lösung 1,68 g Trockensubstanz. — Die Verwertung des Ammonitrats durch *Aspergillus niger* hat in letzterer Zeit noch W. Brenner untersucht. Da er aber nur eine vorläufige Mitteilung ohne jegliche Zahlenangaben veröffentlicht hat (Untersuchungen über die Stickstoffernährung des *Aspergillus niger* usw.; Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 29, 479, 1911), so kann ich seine Resultate mit den meinigen nicht vergleichen. Doch läßt seine Bemerkung, daß die der N-Quelle entstammenden, in der Kulturflüssigkeit sich ansammelnden Stoffe, falls sie sauren Charakters sind, als solche in der Flüssigkeit bleiben (S. 482), vermuten, daß ihm die von mir oben dargelegten Verhältnisse unbekannt geblieben sind.

¹⁾ Ritter, Jahrb. f. wiss. Bot. 1913, S. 351 bis 366.

²⁾ Klebs, Die Bedingungen der Fortpflanzung. 1896, S. 531.

³⁾ Kiesel, l. c.

Kombination vom *Aspergillus niger* sogar viel besser ausgenutzt wird als KNO_3 und andere Nitrate, die zur Anhäufung größerer Oxalatsmengen und dadurch zu einer schlechteren Verwertung des Zuckers führen.

Als Beispiel sei folgender Versuch angeführt: Die Nährlösung bestand aus 5% Rohrzucker, 0,02% KH_2PO_4 und 0,01% MgSO_4 ¹⁾; als Stickstoffquelle wurde in die erste Versuchreihe Ammontartrat, in die zweite Salpetersäure eingeführt, und zwar in solcher Menge, daß 100 ccm Nährlösung 22,7 mg N enthielten, was einer Konzentration von 0,0162 Mol HNO_3 entsprach. Je 50 ccm Nährlösung kamen in Erlenmeyer-Kolben wie oben. Jedes Kölbchen enthielt also 11,35 mg N.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle V zusammengestellt²⁾.

Tabelle V.
Aspergillus niger ($t = 32^\circ$).

Versuchsdauer	Stickstoffquelle Ammontartrat (11,35 mg N)		Stickstoffquelle Salpetersäure (11,35 mg N)	
	Trockengewicht	N des Mycels (nach Kjeldahl)	Trockengewicht	N des Mycels (nach Kjeldahl)
	g	mg	g	mg
2 Tage	0,285	8,3	0,050	3,0
4 "	0,375	9,1	0,307	9,1
6 "	0,385	8,3	0,466	9,9
8 "	0,390	8,8	0,452	10,1

Wir sehen, daß die Kulturen auf Salpetersäure nur anfangs hinter denjenigen auf Ammontartrat zurückbleiben; die entwicklungshemmende Wirkung der HNO_3 macht sich eben auch in dieser schwachen Konzentration geltend. Nach 6 bis 8 Tagen kommen sie aber den ersteren gleich und überholen sie sogar. Sowohl das Trockengewicht als auch die vom Mycel

¹⁾ Die Salzkonzentration wurde absichtlich so niedrig bemessen, um dem Einwand zu begegnen, daß es sich in meinen Versuchen um eine Assimilation der in der Lösung entstandenen Nitrate und nicht der freien Salpetersäure handele. Übrigens sind sogar 0,1% Lösungen KH_2PO_4 so stark dissoziiert, daß wir es immer nur mit Ionen zu tun haben. Es handelt sich also eben um die Assimilation des Stickstoffs aus NO_3^- -Ionen in Gegenwart freier H-Ionen.

²⁾ Einer eventuellen Absorption von Ammoniak aus der Laboratoriumsluft wurde durch Unterbringen der Kulturen unter eine Glasglocke und Durchsaugen von durch H_2SO_4 gereinigter Luft vorgebeugt.

gespeicherte Stickstoffmenge ist in den Salpetersäurekulturen höher als in den Ammonkulturen.

Auf stärkeren Salpetersäurelösungen (0,03 Mol) entwickelt sich *Aspergillus niger* noch langsamer, aber nach 12 Tagen entsteht auf 50 ccm Nährlösung dennoch ein vollkommen normales, sporentragendes Mycel, das unter Ausnutzung von zirka 90% des Salpetersäurestickstoffs ein Trockengewicht von 0,870 bis 0,890 g erreicht.

Durch eine besondere Versuchseinrichtung konnte ich es erreichen, durch allmähliche Zuführung einer 0,016 Mol HNO_3 enthaltenden Nährlösung innerhalb 30 Tagen eine enorme Pilzdecke heranzüchten. Ihr Trockengewicht betrug 5,060 g; der Stickstoffgehalt 112,2 mg.

Diesen mit *Aspergillus niger* erzielten Ergebnissen lassen sich noch ähnliche mit einem anderen (durch elektive Kultur erhaltenen *Penicillium*) Schimmelpilz anreihen. Ich erhielt damit in 20 Tagen (bei 20°) ein Trockengewicht von 0,600 g auf 0,016 Mol HNO_3 , und von 0,790 g auf 0,032 Mol HNO_3 (50 ccm Nährlösung).

Auch die Heranzüchtung einer großen Pilzdecke durch allmähliche Zuführung einer salpetersäurehaltigen Nährlösung konnte mit diesem Schimmelpilz erfolgreich wiederholt werden. Es entstand nach 36 Tagen ein Mycel von 4,557 g Trockengewicht mit 109,5 mg N.

Durch die hier kurz mitgeteilten Tatsachen glaube ich nun endgültig erwiesen zu haben, daß die freie Salpetersäure, in geeigneten Konzentrationen angewandt, eine ausgezeichnete Stickstoffquelle für *Aspergillus niger* und einige andere Schimmelpilze ist. Der Salpetersäurestickstoff wird von den Pilzen besser ausgenutzt als der N der Nitrate und Ammonsalze und dementsprechend ein hohes Trockengewicht der Pilzernte erzielt.

Tricalciumphosphat als Knochenbildner beim menschlichen Säugling¹⁾.

Von

Ernst Schloß und Leonhard Frank.

(Aus dem Großen Friedrichs-Waisenhaus der Stadt Berlin in Rummelsburg und der chemischen Abteilung des städtischen Untersuchungsamtes.)

(Eingegangen am 21. Februar 1914.)

Mit 2 Figuren im Text.

Die Frage nach der Verwertung anorganischer Salze für den Aufbau des tierischen und besonders des menschlichen Organismus ist bekanntlich schon seit Jahrzehnten vielfach diskutiert. Anfänglich war die Stellungnahme der Physiologen und Pharmakologen meist ablehnend; nach und nach hat sich aber hierin auf Grund experimenteller Ergebnisse eine Wandlung vollzogen. Zuerst ist für das Eisen hauptsächlich in klinischen Versuchen die Identität der Wirkung von anorganischen und organischen Verbindungen nachgewiesen worden. Für den Kalk wurde das gleiche dann durch exakte Untersuchungen von Aron und Frese²⁾ am Carnivoren dargetan und damit die praktischen Erfahrungen der Tierzüchter bestätigt, wonach das wachsende Tier aus einfachen Futtersalzen seine Knochen aufbauen kann. Umstritten ist noch die Frage nach der Identität der Wirkung anorganischer und „organischer“ Phosphorsäure; doch besteht nach den neueren Untersuchungen kein Zweifel, daß bei Phosphormangel auch das anorganische Molekül in den Tierkörper aufgenommen wird. Betreffs der Literatur zu dieser Frage verweise ich auf die Zusammenstellung Grossers in den Ergebnissen f. innere Medizin und Kinderheilk. 11, 119.

¹⁾ Zugleich V. Mitteilung: Zur Therapie der Rachitis.

²⁾ Diese Zeitschr. 9, 185, 1908.

Auf den wachsenden Menschen sind die Ergebnisse dieser Versuche nicht ohne weiteres übertragbar, wenn auch nach unseren letzten Erfahrungen anzunehmen ist, daß beim mineralarm ernährten gut zunehmenden Säugling eine Zulage von anorganischen Salzen ebenfalls zum Ansatz gelangt.

Von Bedeutung ist die ganze Frage vor allem hinsichtlich der Verhütung und Heilung der kindlichen Rachitis, bei der ja bekanntlich eine Verarmung des Skeletts an Kalk und Phosphorsäure vorhanden ist. Exakte Versuche über die Verwertung von einfachen Kalksalzen beim rachitischen Säugling liegen bisher nur von Schabad¹⁾ und Orgler²⁾ vor. Schabad kam zu dem Ergebnis, daß Calcium aceticum, aber nur in Verbindung mit Phosphorlebertran, vom Säugling retiniert würde, Calciumphosphat aber nicht, während Orgler in seinen Versuchen mit Calcium aceticum allein zu ziemlich negativem Resultat kam und auch die Möglichkeit einer derartigen Retention in Frage zog. In neueren Untersuchungen des einen von uns³⁾ bei natürlich ernährten Kindern hat sich folgendes ergeben: Der Kalk des Calcium aceticum allein kam nicht zur Aufnahme, während die Verabfolgung dieses Salzes ebenso wie des Dicalciumphosphats in Verbindung mit Phosphorlebertran zu einer deutlichen Kalkretention führt. Die Kalk- und auch die Phosphorbilanz bei letzterem Salz war ebensogut wie die von „organischen“ Kalkphosphorverbindungen (Caseinpräparate).

In diesen Fällen schien also der Lebertran notwendig für den Erfolg der Kalktherapie. Nach neueren, noch nicht publizierten Versuchen ist wahrscheinlich in dem Stadium der Spontanheilung der Rachitis auch die alleinige Darreichung von Kalksalzen für den Erfolg ausreichend.

Der eine Versuch mit dem anorganischen Salz konnte selbstverständlich nicht zur Entscheidung der Frage ausreichen, zumal keine völlige Sicherheit für eine dauernde Retention gegeben war, und so schien es bei der praktischen Wichtigkeit dieser Frage geboten, mit einem anderen anorganischen Salz, dem unlöslichen Tricalciumphosphat, nochmals derartige Versuche vorzunehmen, und zwar sowohl bei natürlicher als auch bei künstlicher Nahrung.

Über den Ausfall dieser Versuche soll hier berichtet werden.

¹⁾ Jahrb. f. Kinderheilk. 72, 1, 1910.

²⁾ Monatsschr. f. Kinderheilk. 10, Nr. 7, 1911.

³⁾ E. Schloß, Zur Therapie der Rachitis. I. bis III. Mitteilung. Jahrb. f. Kinderheilk. 78, 694, 1913; 79, 40 u. 194, 1914.

Die Versuchsanordnung gestaltete sich sehr einfach. An einen Vorversuch ohne Medikation wurde zunächst ein Versuch mit Lebertran allein angeschlossen, dann das Tricalciumphosphat zugegeben und nach längerer (mindestens 9 Tage dauernder) Verabreichung, nachdem sich das Kind auf diese Zulage eingestellt haben mußte, der Stoffwechsel unter dieser kombinierten Medikation untersucht. Am Schluß dieses Versuches wurde die Medikation ausgesetzt und unmittelbar daran der Nachversuch angeschlossen, um eine etwaige Wiederausscheidung des zurückgehaltenen Salzes feststellen zu können. Die genauere Versuchsanordnung ergibt sich wohl genügend klar aus den beigefügten Kurven.

Die Versuchskinder standen beide im zweiten Lebensquartal, also in einem Alter, in dem die Rachitis sich zuerst klinisch dokumentiert und am schwersten einer therapeutischen Beeinflussung zugänglich ist. Insofern ist der erzielte Erfolg höher einzuschätzen, als in einem späteren Stadium der Erkrankung, in dem die Neigung zur Spontanheilung größer ist.

Die Analyse erstreckte sich auf den Umsatz von CaO , P_2O_5 , N und die Gesamtalkalien des Kotes. Die Bestimmung des gesamten Alkalistoffwechsels hätte die analytische Arbeit zu sehr vermehrt; zudem hatte sich bei früheren Untersuchungen dabei keine besonders wichtige Tatsache ergeben. Es interessierte uns hier nur die Wirkung der Medikation auf die Verdauungsvorgänge, und so wurde nur in allen Versuchen der Alkalienverlust im Kot bestimmt.

7. Versuchsreihe (bei Frauenmilchernährung).

Diese Versuchsreihe wurde an einem Kinde P. S. angestellt, das längere Zeit ausschließlich mit Ammenmilch ernährt worden war und hierbei die ersten Zeichen einer beginnenden Schädelrachitis zeigte (siehe den ausführlichen Entwicklungsbericht des Anhangs). Das Kind war sonst in recht gutem Ernährungs- und Entwicklungszustand und nahm auch während der ganzen Versuche dauernd zu (vgl. Kurve 1).

Wir sehen entsprechend dem klinischen Bilde auch im Stoffwechsel der Vorperiode eine deutlich unternormale Bilanz von Kalk und Phosphorsäure. Es war also damit die Möglichkeit einer sinnfälligen Besserung gegeben. Inwieweit dies durch die Therapie erreicht wurde, soll nun zunächst an den einzelnen pro die berechneten Werten gezeigt werden.

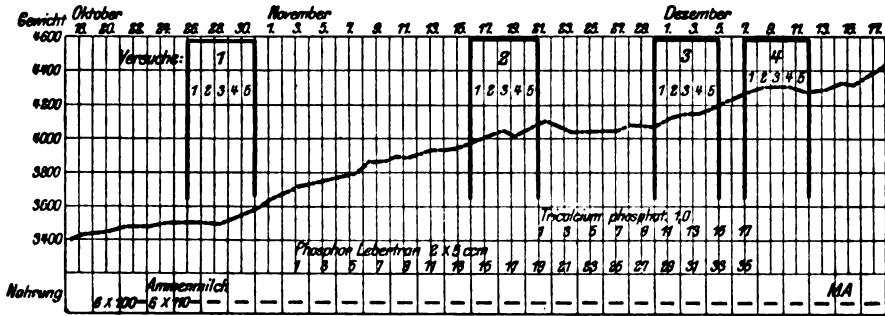


Fig. 1.

Tabelle I.

Kind P. S.

7. Versuchsreihe (bei natürlicher Ernährung).
Versuch 30 bis 33.

Vers.-Nr.	Medikation	Einfuhr		Kot		Urin	Retention	
		a) Nah-rung	b) Zu-lage	absol.	d. Einf. %		absol.	d. Einf. %

N-Umsatz pro die.

30	Ohne	1,050	—	0,205	19,52	0,420	+ 0,425	40,48
31	Lebertran	1,051	—	0,245	23,31	0,522	+ 0,284	27,02
32	Tricalc. phosph. + Lebertran . . .	1,055	—	0,151	14,31	0,435	+ 0,469	44,46
33	Ohne	1,029	—	0,248	24,10	0,462	+ 0,319	31,00

CaO-Umsatz pro die.

30	Ohne	0,282	—	0,196	69,50	0,017	+ 0,069	24,47
31	Lebertran	0,288	—	0,099	34,21	0,018	+ 0,172	59,38
32	Tricalc. phosph. + Lebertran . . .	0,255	0,494	0,288	38,38	0,024	+ 0,439	58,24
33	Ohne	0,276	—	0,136	49,28	0,008	+ 0,134	47,83

P₂O₅-Umsatz pro die.

30	Ohne	0,205	—	0,042	20,49	0,076	+ 0,087	42,44
31	Lebertran	0,205	—	0,040	19,51	0,043	+ 0,122	59,51
32	Tricalc. phosph. + Lebertran . . .	0,183	0,414	0,223	37,35	Spuren	+ 0,375	62,65
33	Ohne	0,184	—	0,062	33,70	0,046	+ 0,076	41,30

Alkalienscheidung im Kot pro die.

Vers.-Nr.	Medikation	KCl + NaCl
30	Ohne	0,094
31	Lebertran	0,162
32	Tricalc. phosph. + Lebertran . . .	0,066
33	Ohne	0,344

1. Der N-Umsatz.

Der Stickstoffumsatz zeigt durchaus den aus den früheren Versuchen bei Ammenmilch bekannten Verlauf. Wir sehen in der Vorperiode (Versuch 30) die gewohnte hohe relative N-Ausfuhr mit dem Kot und trotzdem eine gute N-Bilanz. Die Lebertranzugabe (Versuch 31) führt zu einer geringen Steigerung des Kotverlustes und erhöht noch dazu den Urinwert, so daß eine deutliche Verschlechterung der N-Bilanz resultiert; also dasselbe Verhalten, wie wir es durch Phosphorlebertran in sämtlichen früheren Versuchen bei Ammenmilch (Versuchsreihe 1, 2 und 3, l. c.) gesehen haben. Durch die Zugabe von Calciumphosphat (Versuch 32) wird der Kotwert deutlich herabgesetzt, und auch der Urinwert geht wieder zur ursprünglichen Höhe zurück; es resultiert so eine wesentliche Besserung der N-Bilanz. Nach Aussetzen der Medikation (Versuch 33) wieder neuer Anstieg der N-Ausscheidung und Rückgang des Retentionswertes.

2. Der Kalkumsatz.

In der Vorperiode (Versuch 30) werden über $\frac{2}{3}$ des zugeführten Kalkes wieder im Kot abgegeben; die Retention beträgt ungefähr die Hälfte der Norm.

Als Folge der Lebertrandarreicherung (Versuch 31) sehen wir einen starken Abfall des Kotkalkes und dementsprechend eine bedeutende Verbesserung der CaO-Retention. Der relative Wert erreicht dabei die maximale Höhe der bei einem Brustkind bisher beobachteten Zahlen, und doch ist bei der relativen knappen Zufuhr die absolute Kalkretention nicht ausreichend, etwaige größere Kalkverluste zu decken.

An diesem Kinde, bei dem, wie aus diesem ausgezeichneten Erfolg der Lebertranzufuhr zu schließen ist, die Bedingungen für eine Kalkretention so leicht zu verbessern waren, mußte also der Wert einer Kalkzulage deutlich zutage treten. Das ist nun auch in der Tat der Fall. In der Periode der Darreichung von Lebertran + Tricalciumphosphat (Versuch 32) finden wir einen außerordentlich starken Anstieg der Retention, auf über das 6fache der Vorperiode. Die Retention übersteigt dabei die Einfuhr mit der Milch fast um das Doppelte. Spricht dies schon für die gute Ausnutzung des zugelegten Tricalciumphosphats, so erst recht die Tatsache, daß sowohl die relativen

Zahlen der Kotalausfuhr wie der Retention ungefähr denen der vorhergehenden Periode unter Lebertran allein entsprechen. Auch hier steht der relative Retentionswert an der oberen Grenze des Beobachteten.

Daß diese gute Bilanz nicht etwa nur eine vorübergehende Einlagerung darstellt, sondern daß es sich um einen soliden Ansatz handelt, geht daraus hervor, daß nach dem Aussetzen der Medikation (Versuch 33) der Wert des Kotkalkes, aber auch der des Urinkalkes sofort wieder unter den der Vorperiode sinken, so daß dadurch die Bilanz gegenüber der Vorperiode sogar bedeutend erhöht ist.

3. Der Phosphorsäureumsatz.

Der Umsatz der Phosphorsäure geht dem des Kalkes in der Hauptsache parallel. Auch hier sehen wir in der Vorperiode (Versuch 30) eine unternormale P_2O_5 -Bilanz und unter Lebertran (Versuch 31) eine deutliche Verbesserung der Retention, und zwar durch Einschränkung der Urinausfuhr. Bei der Phosphorsäure bleibt aber trotzdem der Wert noch weit unter der Norm, so daß diese Verbesserung erst recht nicht zur Restitution ausreicht. Hier bringt erst die Zulage des Tricalciumphosphats (Versuch 32) eine wirklich durchgreifende Änderung des Stoffwechsels hervor. Das eingeführte Phosphat wird fast zu $\frac{2}{3}$ resorbiert.

Die absolute Phosphorretention ist so fast die 3fache der Lebertranperiode; auch der relative Wert der Retention liegt trotz der verdreifachten Zufuhr noch höher als unter der alleinigen Darreichung von Lebertran. Ebenso wie beim Kalk läßt sich auch bei der Phosphorsäure die Solidität der Mehrretention nachweisen. Zwar sehen wir in dem Nachversuch (Versuch 33) einen kleinen Anstieg des Kotphosphors gegenüber dem Vorversuch (31); doch wird dieser Ausfall durch die Einschränkung des Urinwertes fast völlig kompensiert. Die absolute Retention ist vielleicht infolge der geringeren Zufuhr um einige Milligramm niedriger als die des Vorversuches, der relative Wert fast der gleiche.

4. Die Alkaliausscheidung im Kot.

In der Vorperiode (Versuch 30) hat die Alkaliensumme des Kotes die gleiche Höhe, wie sie in früheren Versuchen bei

Ammenmilch gefunden wurde (vgl. z. B. Versuch 1 der ersten Mitteilung). Durch die Zufuhr von Lebertran (Versuch 31) wird dieser Wert deutlich erhöht, während er durch die Zugabe von Tricalciumphosphat (Versuch 32) wieder herabgedrückt wird. In der Nachperiode (Versuch 33) findet sich dagegen eine sehr starke Vermehrung der Alkalienausfuhr (Verdauungsstörung! s. u.).

Epikrise.

Wenn wir den ganzen Verlauf des Stoffwechsels, soweit er in dieser Versuchsreihe bestimmt ist, überblicken, so ergibt sich ein eindeutiges Bild.

In der Vorperiode sehr schlechte Kalk- und unternormale Phosphorsäureretention bei durchaus normaler N-Bilanz. Ein Teil des retinierten Phosphors dient also noch dem Aufbau organischer Substanz.

Der Lebertran allein bewirkt eine Verschlechterung der N-Bilanz durch Erhöhung der Ausfuhr im Urin und Kot und eine Vermehrung der Alkaliauscheidung im Kot, dagegen abweichend von dem Ergebnis der drei ersten Versuchsreihen eine deutliche Verbesserung der Kalk- und eine geringere der Phosphorbilanz; ersteres durch Verminderung der Kot-, letzteres durch Verringerung der Urinausfuhr.

Durch die Zugabe von Tricalciumphosphat wird die N-Bilanz deutlich verbessert, die Alkaliauscheidung verringert, weiterhin aber noch die Kalk- und die Phosphorretention extrem erhöht; also eine durchgängige Verbesserung aller untersuchten Stoffe.

In der Nachperiode wird die N-Bilanz wieder schlechter, auch die Alkaliauscheidung steigt stark an; der Kalkumsatz ist gegenüber der Vorperiode deutlich besser, und bei der Phosphorsäure zeigt sich nur eine geringe Verschiebung der Aschenwerte vom Urin zum Kot. Die Phosphorbilanz ist, wenn man die schlechte N-Bilanz berücksichtigt, auch noch relativ besser als die der Vorperiode.

Wenn wir noch die klinische Erklärung zu dem etwas auffallenden Verhalten besonders des N und der Alkalien geben wollen, so können wir folgendes mit gutem Grund annehmen.

Der Lebertran bewirkt an sich eine leichte Verdauungsstörung; diese äußert sich in einer Vermehrung des Kot-N und der Kotalkalien (eventuell ist darauf auch die in den früheren Versuchen nicht gefundene Verbesserung des Kalkstoffwechsels zurückzuführen). Diese dyspeptische Störung, die sich ja auch in voluminösen häufigen Stühlen klinisch äußert, wird durch das Tricalciumphosphat unterdrückt — Kot-N und Alkalien gehen zurück, auch das Kottrockengewicht verringert sich; nach Aussetzen der Medikation wird die Verdauungsstörung wieder manifest. Folge: Vermehrung von N und Alkalien im Kot.

Eine klinische Besserung der Rachitis war erst bei weiterer Medikation nachzuweisen.

8. Versuchsreihe

bei künstlicher Ernährung (molkenadaptierte Milch nach Schloß).

In dieser Versuchsreihe handelt es sich, wie aus dem ausführlichen Entwicklungsbericht am Schluß hervorgeht, gleichfalls um ein sonst gesundes Kind (A. L.), bei dem auch die ersten Erscheinungen der Rachitis in Gestalt einer geringen Erweichung des Hinterhauptes zutage treten. Wir besitzen nun von diesem Kinde aus der früheren Entwicklungsperiode zwei Stoffwechselversuche von A. Peiser, die uns zeigen, daß das Kind schon lange vorher eine schlechte Mineralretention hatte. Ich führe hier gleich die betreffenden Werte aus dieser demnächst erscheinenden Arbeit an.

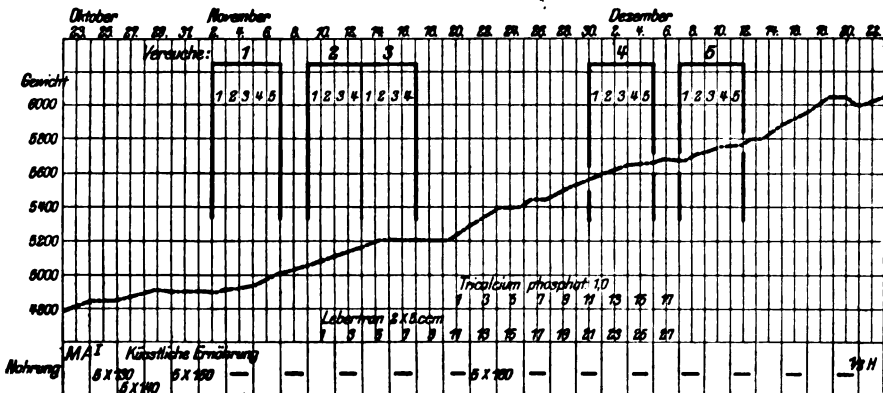


Fig. 2.

Tabelle II.
Kind A. L.

	Einfuhr	Kot		Urin	Retention	
		absolut	d. Einfuhr %		absolut	d. Einfuhr %
Versuch bei Ammenmilch. 13. bis 17. IX. 1913. (A. Peiser.)						
N	0,924	0,172	18,61	0,342	+ 0,410	44,37
P ₂ O ₅	0,228	0,080	35,09	0,090	+ 0,058	25,44
CaO	0,270	0,238	88,15	0,029	+ 0,003	1,11
Versuch bei Eiweißmilch. 3. bis 7. X. 1913. (A. Peiser.)						
N	3,306	0,450	13,61	1,905	+ 0,951	28,77
P ₂ O ₅	0,980	0,445	45,41	0,463	+ 0,073	7,45
CaO	0,714	0,813	113,90	0,051	- 0,151	- 21,15

Wir sehen hier in der Ammenmilchperiode bei normaler N-Retention eine stark unternormale Phosphor- und eine eben noch positive Kalkbilanz.

In der Periode mit Eiweißmilch ist die N-Retention stark übernormal, die Phosphorbilanz entsprechend etwas höher als bei Ammenmilch, dagegen die Kalkbilanz deutlich negativ.

Es ist nun interessant, demgegenüber das Resultat der Vorperiode bei molkenadaptierter Milch (Versuch 34) zu beobachten. Die N-Retention ist wieder sehr viel niedriger. Entsprechend dieser niedrigen N-Bilanz ist auch die Phosphorretention recht gering, während die Kalkretention wieder positiv ist und dabei sogar noch einen höheren Wert zeigt als bei Ammenmilch.

1. Der N-Stoffwechsel.

Im allgemeinen ist hier der Verlauf des Umsatzes ähnlich dem der vorigen Versuchsreihe. Auch hier bewirkt Lebertran eine Verschlechterung der N-Bilanz, besonders durch Vermehrung der N-Ausscheidung im Urin. Der Kot-N ist in der ersten Periode (Versuch 35) etwas niedriger, um in der zweiten etwas höher zu werden, so daß sich diese Schwankungen ungefähr ausgleichen.

Die weitere Beurteilung des N-Umsatzes ist dadurch etwas kompliziert, daß nunmehr eine viel eiweißreichere Nahrung zur Verwendung kam (vgl. Anhang S. 390). Immerhin ist folgendes klar ersichtlich. Das Kind mußte sich in der langen Vorperiode (11 Tage) auf diese Erhöhung der N-Zufuhr eingestellt haben.

Tabelle III.

Kind A. L.

8. Versuchsreihe (bei künstlicher Ernährung).

Versuch 34 bis 38.

Vers.-Nr.	Medikation	Einfuhr		Kot		Urin	Retention	
		a) Nah- rung	b) Zu- lage	absol.	d. Einf. %		absol.	d. Einf. %
N-Umsatz pro die.								
34	Ohne	1,179	—	0,176	14,93	0,704	+ 0,299	25,36
35	Lebertran . . .	1,216	—	0,130	10,69	0,893	+ 0,193	15,87
36	"	1,208	—	0,195	16,14	0,778	+ 0,235	19,45
37	Tricalc. phosph. + Lebertran .	2,168	—	0,220	10,15	1,423	+ 0,525	24,22
38	Ohne	2,086	—	0,497	23,83	1,207	+ 0,882	18,31
CaO-Umsatz pro die.								
34	Ohne	0,426	—	0,351	82,40	0,015	+ 0,060	14,08
35	Lebertran . . .	0,432	—	0,243	56,28	0,014	+ 0,175	40,55
36	"	0,429	—	0,273	63,64	0,015	+ 0,141	32,89
37	Tricalc. phosph. + Lebertran .	0,546	0,494	0,787	75,65	0,015	+ 0,238	22,90
38	Ohne	0,523	—	0,436	83,47	0,008	+ 0,079	15,01
P ₂ O ₅ -Umsatz pro die.								
34	Ohne	0,491	—	0,154	31,39	0,335	+ 0,002	0,41
35	Lebertran . . .	0,498	—	0,110	21,99	0,351	+ 0,037	7,43
36	"	0,494	—	0,106	21,51	0,328	+ 0,060	12,15
37	Tricalc. phosph. + Lebertran .	0,741	0,414	0,404	35,00	0,346	+ 0,405	35,05
38	Ohne	0,702	—	0,190	27,09	0,393	+ 0,119	16,89

Alkalienausscheidung im Kot pro die.

Vers.-Nr.	Medikation	KCl + NaCl
34	Ohne	0,108
35	Lebertran	0,084
36	"	0,104
37	Tricalc. phosph. + Lebertran . . .	0,502
38	Ohne	0,513

Wenn wir trotzdem die N-Retention unter Tricalciumphosphat + Lebertran über doppelt so hoch finden wie in der Periode mit Lebertran allein, so weist das auf die gleiche günstige Wirkung dieser Salzzulage zum Lebertran hin, wie wir sie bei Ammenmilch ganz einwandfrei in der vorhergehenden Versuchsreihe gesehen haben. Dafür spricht dann auch noch die Tat-

sache, daß nach dem Aussetzen der Medikation die N-Retention deutlich absinkt, und zwar ebenfalls wieder durch starke Vermehrung des Kotverlustes. Also auch hierin eine genaue Übereinstimmung mit dem Versuch bei Ammenmilch (Kind P. S.).

2. Der Kalkstoffwechsel.

Der niedrige Retentionswert der Vorperiode (Versuch 34) wird durch die Lebertranmedikation (Versuch 35) sofort in die Höhe geschraubt. Die Kalkbilanz ist fast verdreifacht. Interessanterweise steigt aber bei weiterer Medikation (Versuch 36) der Wert nicht noch an, wie wir es bei früheren Versuchen gesehen¹⁾, sondern nimmt in der zweiten Lebertranperiode wieder etwas ab. Dadurch hebt sich die Retentionsverbesserung durch das zugelegte Tricalciumphosphat, die an und für sich nicht so beträchtlich ist, deutlicher ab (Versuch 37). Daß von diesem retinierten Kalk in den ersten 5 Tagen kaum etwas wieder ausgeschieden wurde, ergibt sich aus den Werten der Nachperiode (Versuch 38), wo sowohl die relative Kotausfuhr als auch die relative Retention ungefähr denen der Vorperiode (Versuch 34) entsprechen, und die absolute Retention sogar noch etwas höher liegt.

3. Der Phosphorsäurestoffwechsel.

Viel deutlicher liegen die Verhältnisse beim Phosphorsäureumsatz. Hier ist die Retention der Vorperiode (Versuch 34) extrem niedrig und bleibt auch unter der Lebertranmedikation (Versuch 35 und 36) noch stark unternormal, wenn auch hier umgekehrt wie beim Kalk die Werte mit der Dauer der Medikation ansteigen. Durch die Zugabe des anorganischen Salzes (Versuch 37) schnellte die Retention außerordentlich in die Höhe, erreicht also einen ganz übernormalen Wert. Auch hier finden wir in der Nachperiode (Versuch 38) die relative Kotausfuhr nicht höher als in der Vorperiode; die absolute Kot- und Urinausfuhr ist allerdings entsprechend der Steigerung der Zufuhr erhöht, aber auch die absolute und relative Retention ist gegenüber dem Vorversuch (Nr. 34) außerordentlich erhöht, so daß auch hier kaum die Annahme einer nachträglichen Wiederabgabe der retinierten Phosphorsäure zulässig ist.

¹⁾ Vgl. IV. Mitteilung.

In dieser Versuchsreihe sehen wir ähnlich wie bei den früheren Versuchen mit Lebertran und Phosphorlebertran¹⁾ die Urinausscheidung in der Vorperiode relativ hoch, die Kotausfuhr recht niedrig. Der Lebertran drückt die Kotausfuhr so stark herab, wie es hier überhaupt nur möglich ist; die Ausfuhr mit dem Urin scheint auch hier eine gegebene Größe zu sein, die von der Zufuhr ganz unabhängig ist (vgl. die Ausführungen l. c.).

Insofern wird es verständlich, daß in diesen Fällen die Phosphorzulage trotz vorherigen genügenden Angebotes die Retention verbessert, da erst die hohe Urinabgabe gedeckt werden muß, bevor es zu einem Ansatz kommen kann.

4. Die Alkaliausscheidung im Kot.

Die Summe der Alkalien ist in der Vorperiode (Versuch 34) ungefähr die gleiche wie bei Ammenmilch (Versuch 30). Die Lebertranzufuhr (Versuch 35 und 36) bewirkt eher eine Verminderung der Alkalien. Dagegen steigen sie unter der kombinierten Behandlung (Lebertran + Tricalciumphosphat) zu der 5fachen Menge an (Versuch 37) und verharren auch in der Nachperiode (Versuch 38) auf dieser Höhe. Diese hohe Alkaliausscheidung ist wohl die Folge der in diesen beiden letzten Versuchsperioden herrschenden gesteigerten Kotbildung.

Epikrise.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe entsprechen fast durchgängig denen der vorhergehenden.

In der Vorperiode sehr schlechte Kalk- und Phosphorbilanzen bei normalhoher N-Retention.

Lebertran bewirkt eine Verschlechterung der Stickstoffbilanz durch Vermehrung der Urinausfuhr, verbessert etwas die Phosphorbilanz und bringt die Kalkretention auf normale Höhe. Die Alkaliausscheidung im Kot bleibt unverändert.

Die Zugabe von Tricalciumphosphat wirkt anscheinend auch hier günstig auf die N-Bilanz. Die Kalk- und besonders die Phosphorbilanz erreicht übernormale Werte.

¹⁾ Vgl. IV. Mitteilung.

Das Ergebnis der Nachperiode erweist auch hier die Wirkung der kombinierten Medikation als eine nachhaltige, insofern der einmal aufgenommene Kalk nicht wieder abgegeben wird; dasselbe zeigt auch die klinische Beobachtung.

Anhang.

Die Versuchsmethodik war dieselbe wie bei den früheren Versuchen. Als Nahrung diente in dem einen Falle eine Ammenmischmilch, im zweiten eine Konserve der molkenadaptierten Milch, die uns von den Deutschen Milchwerken in Zwingenberg freundlichst zur Verfügung gestellt wurde. Die Absicht, hiermit eine einheitliche Nahrung für sämtliche Versuche zu erhalten, wurde leider dadurch vereitelt, daß die Versuchsnahrung, die für mehrere Kinder bestimmt war, nicht ausreichte, und so in den beiden letzten Versuchen Alfred L. 4 und 5 eine andere Nahrung zur Verwendung kommen mußte, die, wie sich nachträglich herausstellte, einen erheblich höheren Gehalt an N und Mineralstoffen hatte als das erste Präparat.

Der Kot wurde wieder in verzinnten Dosen unter Thymolzusatz aufgefangen und zusammen verarbeitet.

7. Versuchsreihe.

Paul S., wurde im Alter von $1\frac{1}{4}$ Monat mit einem Gewicht von 3100 g bei uns aufgenommen. Das Kind hatte schon eine Dyspepsie durchgemacht, die bei Eiweißmilch geheilt war.

Aufnahmebefund: Ziemlich großes, schlecht genährtes Kind mit blasser, etwas schuppender Haut.

Schädelknochen fest. Nahtränder, besonders in der Nähe der kleinen Fontanelle, etwas weich. Große Fontanelle 3:3. Drüsen in allen Regionen deutlich vergrößert, auch deutliche Cubitaldrüse. Geringer Intertrigo ad Nates. Fußsohlen o. B. Linkes Ohr eitert.

Bei Ernährung mit kleinen Mengen Ammenmilch leidliches Gedeihen trotz dauernd schlechter Stühle. Die Stühle werden allmählich seltener, die Gewichtszunahme ausgezeichnet. Doch stellen sich jetzt schon leichte Zeichen von Rachitis ein. Am 27. X. wird der erste Stoffwechselfersuch bei Ammenmilch vorgenommen. Dann eine Phosphor Lebertranperiode angeschlossen.

Vorher ist der Knochenbefund folgender:

3. XI. Occiput fest. Die Begrenzung der Lambdanaht, besonders rechts, beginnt deutlich zu erweichen. Fontanelle 3:3, sonst Zustand gut.

In der Phosphor-Lebertranperiode sind die Stühle nicht schlechter. Das Gewicht nimmt aber weiter zu. Am 17. XI. nach 14 tägiger Medikation Stoffwechselfersuch unter Phosphor-Lebertran. Dann wird sofort Tricalciumphosphat zugegeben und nach 9 Tagen der dritte Versuch an-

geschlossen. 2 Tage nach Schluß dieses Versuches folgt die Nachperiode ohne Medikation.

15. XII. Erweichung der Lambdanaht noch vorhanden. Dazu aber noch linkes Scheitelbein an einzelnen Stellen nachgiebig. Fontanelle $2\frac{1}{2}$ × $2\frac{1}{2}$. Sagittalnaht, besonders in den hinteren Partien, nachgiebig.

Nun wird die kombinierte Medikation wieder neu angefangen und 6 Wochen lang weitergegeben. Dabei allmähliche Heilung der Rachitis.

Am 2. II. 1914 wird das Kind ohne jedes Zeichen von Rachitis entlassen.

Versuchsdaten.

Kind P. S.

Versuch 1.

Dauer 5 Tage, vom 27. bis 31. X. 1913.

Gewicht am Anfang des Versuchs 3650 g,

 " " Ende " " 3800 g,

Gesamtzunahme 150 g = 30 g pro die.

Nahrungsmenge in 5 Tagen: 3259 g.

Stuhl: Häufig, zerfahren, dünn.

Gewicht des trockenen Kotes: 20,5 g.

Aufgefüllter Urin: 2500 ccm¹⁾.

Versuch 2.

Dauer 5 Tage, vom 17. bis 21. XI. 1913.

Gewicht am Anfang des Versuchs 3990 g,

 " " Ende " " 4100 g,

Gesamtzunahme 110 g = 22 g pro die.

Nahrungsmenge in 5 Tagen: 3216 g.

Stuhl: Dünn, schleimig, zerfahren.

Gewicht des trockenen Kotes: 27,0 g.

Urinmengen: 1. Tag 398 ccm

2. " 385 "

3. " 465 "

4. " 487 "

5. " 450 "

2185 ccm = 437 ccm pro die.

Versuch 3.

Dauer 5 Tage, vom 1. bis 5. XII. 1913.

Gewicht am Anfang des Versuchs 4100 g,

 " " Ende " " 4220 g,

Gesamtzunahme 120 g = 24 g pro die.

Nahrungsmenge: 3274 g in 5 Tagen.

Stuhl: Zerfahren, schleimig, häufiger.

Gewicht des trockenen Kotes: 15,7 g.

¹⁾ Die Zahlen der Tagesmengen sind verloren gegangen.

Urinmengen:	1. Tag	400 ccm
	2. "	419 "
	3. "	452 "
	4. "	415 "
	5. "	391 "
		<hr/>
		2077 ccm = 415 ccm pro die.

Versuch 4.

Dauer 5 Tage, vom 8. bis 12. XII. 1913.
 Gewicht am Anfang des Versuchs 4290 g,
 " " Ende " " 4300 g,
 Gesamtzunahme 10 g = 2 g pro die.

Nahrungsmenge: 3280 g.

Stuhl: Zerfahren, schleimig, häufiger.

Trockenkot: 38,5 g.

Urinmengen:	1. Tag	404 ccm
	2. "	330 "
	3. "	355 "
	4. "	366 "
	5. "	364 "
		<hr/>
		1819 ccm = 364 ccm pro die

8. Versuchsreihe.

Alfred L., geboren am 26. VII. 1913, wurde im Alter von 14 Tagen bei uns aufgenommen und zunächst mit Ammenmilch ernährt.

Der Aufnahmebefund war folgender:

Leidliches Kind mit rosiger Hautfarbe, etwas schlaffem Gewebsturgor und mäßiger Agilität. Haut: Am Gesicht, besonders an der linken Wange geringes exsudatives Ekzem, ebenso am Abdomen. Mäßiger Intertrigo der Nates. Fußsohlen: Fersen abschilfernd, einzelne, kleinstecknadelkopfgroße, rötliche Flecken. Handteller: o. B. Drüsen in allen Regionen mäßig vergrößert. Schädelknochen fest. Sagittalnaht etwas federnd. Große Fontanelle $3\frac{1}{2}:3\frac{1}{2}$. Rachen gerötet. Mäßiger Soor der Mundhöhle. Thorax: Abnorm weich. Kein Rosenkranz. Abdomen weich. Milz und Leber eben palpabel.

Bei geringen Mengen Ammenmilch (6×80) nimmt das Kind trotz dauernd häufiger Stühle gut zu.

Vom 13. bis 17. IX. wird noch bei Ammenmilch ein Stoffwechselforschungsvorhaben vorgenommen und das Kind dann auf Eiweißmilch umgesetzt. Auch hierbei gutes Gedeihen bei besseren Stühlen. Von 3. bis 7. IX. ein Stoffwechselforschungsvorhaben bei Eiweißmilch. Ende Oktober Übergang auf molkenadaptierte Milch und hierbei nach 14 Tagen Beginn der Versuche (3. XI.).

Der Knochenbefund bei Beginn der Versuche war folgender:

3. XI. Schädel fest. Coronarnaht fest. Sagittalnaht beginnt besonders hinten zu erweichen. Deutliche Erweichung, besonders am Außenrand der rechten Lambdanaht. Große Fontanelle 3:3.

Es folgen nun die Versuche, die alle glatt verlaufen. Unter der Zugabe von Tricalciumphosphat zum Lebertran werden die Stühle voluminöser und häufiger und bleiben dies auch noch in der Nachperiode; irgendwelche Zeichen einer direkten Verdauungsstörung fehlen sonst; die rachitischen Erscheinungen werden immer geringer.

13. XII. Ende der Versuche. Kind ist in recht gutem Zustand. Keine Erscheinungen von Rachitis mehr.

29. XII. Entlassung.

Kind A. L.

Versuch 1.

Dauer 5 Tage, vom 3. bis 7. XI. 1913.

Gewicht am Anfang des Versuchs 4900 g,

„ „ Ende „ „ 5030 g,

Gesamtzunahme 130 g = 26 g pro die.

Nahrungsmenge in 5 Tagen: 361,1 g.

Stuhl: Geformt, etwas weicher, alkalisch, gelblich.

Gewicht des trockenen Kotes: 20,4 g.

Urinmengen: 1. Tag 425 ccm

2. „ 510 „

3. „ 444 „

4. „ 478 „

5. „ 526 „

2383 ccm = 477 ccm pro die.

Versuch 2.

Dauer 4 Tage, vom 10. bis 13. XI. 1913.

Gewicht am Anfang des Versuchs 5070 g,

„ „ Ende „ „ 5180 g,

Gesamtzunahme 110 g = 27,5 g pro die.

Nahrungsmenge in 4 Tagen: 2930 g.

Stuhl: Geformt, weich, gelb, sauer.

Gewicht des trockenen Kotes: 11,7 g.

Urinmengen: 1. Tag 449 ccm

2. „ 575 „

3. „ 465 „

4. „ 520 „

2009 ccm = 502 ccm pro die.

Versuch 3.

Dauer 4 Tage, vom 14. bis 17. XI. 1913.

Gewicht am Anfang des Versuchs 5180 g,

„ „ Ende „ „ 5200 g,

Gesamtzunahme 20 g = 5 g pro die.

Nahrungsmengen in 4 Tagen: 2906,4 g.

Stuhl: Geformt, weich, gelblich, alkalisch.

Gewicht des trockenen Kotes: 17,5 g.

Urinmengen: 1. Tag 570 ccm
2. " 499 "
3. " 530 "
4. " 475 "

2074 ccm = 519 ccm pro die.

Versuch 4.

Dauer 5 Tage, vom 1. bis 5. XII. 1913.
Gewicht am Anfang des Versuchs 5580 g,
" " Ende " " 5680 g,
Gesamtzunahme 100 g = 20 g pro die.

Nahrungsmenge in 5 Tagen: 3900 g.

Stuhl: Zerfahren, schleimig, ca. 2 mal am Tage, sauer.

Gewicht des trockenen Kotes: 75,0 g.

Urinmengen: 1. Tag 404 ccm
2. " 337 "
3. " 435 "
4. " 430 "
5. " 354 "

1960 ccm = 392 ccm pro die.

Versuch 5.

Dauer 5 Tage, vom 8. bis 12. XII. 1913.
Gewicht am Anfang des Versuchs 5680 g,
" " Ende " " 5790 g,
Gesamtzunahme 110 g = 22 g pro die.

Nahrungsmenge in 5 Tagen: 3900 g.

Stuhl: Zerfahren, schleimig, häufig, sauer.

Gewicht des trockenen Kotes: 62,5 g.

Urinmengen: 1. Tag 417 ccm
2. " 294 "
3. " 368 "
4. " 398 "
5. " 382 "

1859 ccm = 372 ccm pro die.

Über ein tonometrisches Verfahren zur Bestimmung des Gleichgewichtes zwischen Säuren und Basen im Organismus.

Von

P. Morawitz und J. Chandler Walker (Boston, Mass.).

(Aus der Medizinischen Poliklinik in Freiburg i. B.)

(Eingegangen am 20. Februar 1914.)

Mit 3 Figuren im Text.

I. Einleitung.

Magnus-Levy¹⁾ weist in v. Noordens Handbuch der Pathologie des Stoffwechsels darauf hin, daß unsere Anschauungen über die Reaktion des Blutes sich im Laufe der letzten Jahrzehnte erheblich verschoben haben. Auch die Methoden sind andere geworden: Alle früheren Untersucher titrierten Blut oder Blutplasma mit einer verdünnten Mineralsäure oder organischen Säure nach Zusatz eines Farbstoffes als Indicator. Die Blutalkalescenz wurde ausgedrückt durch die Säuremenge, die bis zum Farbumschlag zugesetzt werden mußte. Bei Gelegenheit dieser Untersuchungen zeigte sich die eigentümliche Erscheinung, daß die einzelnen Forscher schon für das normale Blut absolut verschiedene Alkalescenzwerte ermittelten. Diese Differenzen hingen mit der Methodik zusammen. A. Loewy²⁾ wies z. B. nach, daß man bei der Titration deckfarbenen Blutes, die früher viel geübt wurde, viel niedrigere Werte bekommt, als wenn man das Blut vorher durch Auflösung der roten Blutzellen lackfarben macht, d. h. also: Es treten aus den Blutzellen säurebindende Substanzen in das Plasma über. Ihre Menge kann sehr erheblich sein. F. Kraus³⁾ konnte diese

¹⁾ Magnus-Levy, Physiologie des Stoffwechsels, in v. Noordens Handb. d. Pathol. d. Stoffw., 2. Aufl., S. 192ff.

²⁾ A. Loewy, Arch. f. d. ges. Physiol. 58, 462, 1898.

³⁾ F. Kraus, Prager med. Wochenschr. 1899, Nr. 14.

Tatsache bestätigen. Seitdem wurde fast ausschließlich lackfarbened Blut titriert, entweder mit Weinsäure oder verdünnten Mineralsäuren. Der Indicator ist bei Loewy Lackmoid, bei Kraus Methylorange.

Es trat bei den Untersuchungen von Kraus zutage, daß neben den Blutzellen auch die Eiweißkörper des Blutplasmas für die Gesamtalkalescenz von Bedeutung sind. Kraus zeigte nämlich, daß der größte Teil der sog. Alkalescenz, also der Säurebindungsfähigkeit des Serums oder Plasmas, von den Eiweißkörpern abhängig ist. Entfernt man diese, z. B. durch Niederschlagen mit Ammonsulfat, so erhält man viel geringere Werte als mittels der Loewyschen Methode. Es ist also klar, daß bei dieser Methode auch schon mäßige Schwankungen im Prozentgehalt der Serumeiweißkörper erhebliche Änderungen der gesamten Alkalescenz nach sich ziehen müssen. Solche Schwankungen können durch Hydrämie oder aber durch Eindickung des Blutes leicht zustande kommen. Sie haben natürlich mit Reaktionsänderungen im engeren Sinne des Wortes nichts zu tun, können aber doch schon nennenswerte Ausschläge bei Anwendung der Loewyschen Methode veranlassen. Endlich hat Brandenburg¹⁾ noch den Begriff der „Alkalispannung“ oder des diffusiblen Alkalis eingeführt. Dieses hält sich unabhängig von der Gesamtalkalescenz ziemlich konstant. Brandenburg ist geneigt, dem diffusiblen Alkali eine größere physiologische Bedeutung zuzuschreiben als der Gesamtalkalescenz, eine Ansicht, die sich ungefähr mit der Auffassung von Kraus deckt.

Man versteht, daß bei dieser ungeklärten Lage der Dinge die älteren Bestimmungen der Gesamtalkalescenz recht skeptisch beurteilt werden müssen. Ist es richtig, das Blut lackfarben zu machen? Ist es notwendig, die Eiweißkörper nach dem Vorgange von Kraus zu fällen und die Bestimmungen im Filtrat vorzunehmen? Hat endlich das diffusible Alkali größere Bedeutung? Welchen Indicator soll man wählen? Kurz, es bleibt unklar, welche der Methoden die richtigen, d. h. die physiologisch oder pathologisch bedeutsamen Änderungen der Reaktion wiedergibt. Wie wenig einige dieser Me-

¹⁾ Brandenburg, Zeitschr. f. klin. Med. **36**, 1899; **45**, 1902.

thoden geeignet scheinen, Aufschluß über biologisch wichtige Fragen zu geben, geht z. B. aus folgender Tatsache hervor: Nach Loewy kann auch bei diabetischer Acidose die titrierbare Alkaleszenz des Blutes etwa normale Werte erreichen oder sogar übersteigen, eine Beobachtung, die an sich gewiß richtig sein wird, die aber doch Zweifel erwecken muß, ob die gesamte Methodik überhaupt für biologische Zwecke brauchbar ist.

Man darf wohl sagen, daß alle diese Methoden, die sich nie großen Vertrauens erfreut haben, heute veraltet und überholt sind. Es gibt heute nur noch zwei Verfahren, welche die Anforderungen erfüllen, die man an eine biologisch richtige Methode der Alkaleszenzbestimmung stellen muß: Das ist erstens die Bestimmung der sog. aktuellen Reaktion, d. h. der Ionenkonzentration des Blutes, wie sie von Hoeber¹⁾ eingeführt wurde. Zweitens stehen noch einige Methoden zur Diskussion, die sich auf die Bestimmung des Kohlensäuregehaltes im Blute gründen. Ihren Ausgang nehmen diese Methoden von den bekannten Untersuchungen Walters²⁾ und H. Meyers³⁾ über Säurevergiftung.

Bevor wir auf diese Verfahren eingehen, wäre mit einigen Worten darzulegen, was mit derartigen Alkaleszenzbestimmungen überhaupt erreicht oder bezweckt werden kann. Die moderne physikalisch-chemische Forschung hat bekanntlich gezeigt, daß Blut nicht, wie man früher annahm, eine stark alkalische, sondern nur eine äußerst schwach alkalische Flüssigkeit ist. Blut enthält nur wenig mehr OH- als H-Ionen. Trotzdem wird es, wie Magnus-Levy⁴⁾ treffend bemerkt, auch in Zukunft für die biologische Betrachtung eine alkalische Flüssigkeit bleiben. Denn den Biologen interessiert eine Änderung der Reaktion des Blutes nur insofern, als sie einen Indicator abgibt für abnorme Stoffwechselforgänge. Und diese sind vorwiegend in einer pathologisch erhöhten Säurebildung zu suchen. Das Blut nimmt die Säuren auf und neutralisiert sie. Es verhält sich also — und das ist durch seine ungemein komplizierte Zusammensetzung bedingt — trotz seiner neutralen

¹⁾ Hoeber, Arch. f. d. ges. Physiol. 81, 522, 1900.

²⁾ Walter, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 7, 148, 1877.

³⁾ H. Meyer, ebenda 17, 304, 1885.

⁴⁾ Magnus-Levy, l. c.

aktuellen Reaktion wie eine alkalische Flüssigkeit. In der Erkennung abnormer Säurebildung, also der Acidose, ist der Hauptwert derartiger Untersuchungen nach der biologischen Richtung hin zu finden. Übermäßige Bildung alkalischer Valenzen im Körper ist unseres Erachtens biologisch bedeutungslos. Denn im Organismus steht überall und immer eine übergroße Kohlensäuremenge zur Verfügung, die zur Salzbildung dienen kann, während das Ammoniak zur Neutralisation von Säuren oft nicht zu genügen scheint.

Von den Methoden, die heute zur Bestimmung biologisch bedeutsamer Reaktionsänderungen der Körperflüssigkeiten dienen, hat die Kohlensäuremethode von Walter lange Zeit relativ wenig Beachtung gefunden. Das lag zum Teil wohl daran, daß sie schon a priori nicht ganz einwandfrei erscheint. Walter bestimmte den Kohlensäuregehalt im Blute säurevergifteter Tiere. Er fand eine enorme Abnahme der Kohlensäure, die er auf eine Säuerung des Blutes zurückführte. Die Kohlensäureverminderung diente als Maß der Säurevergiftung. Ähnliche Beobachtungen machte H. Meyer bei anderen Intoxikationen. Beim Coma diabeticum des Menschen fand Minkowski¹⁾ eine hochgradige Verminderung der Kohlensäure im venösen Blute. Der Kohlensäuregehalt ging bisweilen bis auf 25⁰/₀ der normalen Werte herunter. Das stand im Einklang mit der Auffassung des Koma als Säurevergiftung.

Auch Kraus fand bei fiebernden Erkrankungen eine Abnahme des Kohlensäuregehaltes.

So wertvoll diese Befunde sind, so kann man gegen das Verfahren selbst mancherlei einwenden: Zunächst ist der Kohlensäuregehalt des Blutes ja sicher nicht allein von dem Verhältnis der basischen und sauren Valenzen zueinander abhängig, sondern auch in hohem Grade von der Atemmechanik. Hyperventilation, die gerade im Tierexperiment oft entsteht, wird den Kohlensäuregehalt des Blutes vermindern, behinderte oder ungenügende Atmung ihn erhöhen. Das hebt besonders Magnus-Levy hervor. Und neuerdings weiß man durch die Versuche Haldanes²⁾, wie sehr man durch willkürlich vertiefte

¹⁾ Minkowski, *Mittel. a. d. med. Klin. Königsberg* 1888, 174.

²⁾ Haldane und Poulton, *Journ. of Physiol.* 37, 390, 1908.

Atmung den Kohlensäuregehalt in Blut und Gewebe herabzusetzen vermag.

Zweitens spielt natürlich auch die Kohlensäurebildung in den Geweben eine Rolle. Wird sie vermindert, und das kann man für manche Vergiftungen annehmen — speziell für die CO-Vergiftung —, dann kann auch der Kohlensäuregehalt des Blutes sich unabhängig von dessen Alkaleszenz ändern.

Das sind recht schwerwiegende Einwände. Noch wichtiger ist aber die prinzipielle Frage, ob der Kohlensäuregehalt des Blutes überhaupt als Maß von Reaktionsverschiebungen in den Körpersäften brauchbar ist. Eine eingehende theoretische Begründung hat Walter nicht gegeben, und sie stand auch bis in die neueste Zeit aus.

Erst mit Entwicklung der physikalischen Chemie konnte an eine theoretische Erörterung des Verfahrens gegangen werden. Sie findet sich in dem ausgezeichneten Aufsatz von L. I. Henderson¹⁾. Henderson gelangt auf Grund physikalisch-chemischer Versuche und theoretischer Betrachtungen zu der Vorstellung, daß es eine Beziehung zwischen der wahren Alkaleszenz und dem Kohlensäuregehalt geben muß, gleiche Kohlensäurespannung vorausgesetzt. Bezüglich der theoretischen Begründung verweisen wir auf die Arbeit von Henderson. Einige Sätze seien aber doch wörtlich zitiert:

„Die Messung des Kohlensäuregehaltes des Blutes besitzt einen anderen Vorteil darin, daß die Konzentration des Natriumbicarbonates des Blutes sich ganz parallel mit der Konzentration jener anderen Substanzen bewegt, die fähig sind, Säure zu neutralisieren. D. h.: Es gibt eine nahe Beziehung zwischen dem Kohlensäuregehalt und dem physiologischen Neutralisationsvermögen.“

„Klarerweise besitzt die Bestimmung der Kohlensäure den großen Vorteil, daß die gemessene Quantität großen Variationen unterworfen ist, und dies, zusammen mit ihrer klaren theoretischen Begründung, genügt, um ihr einen großen Wert als Bestimmungsmittel des wirklichen Gleichgewichtes im Blut zu verleihen.“

Ausdrücklich bemerkt Henderson, daß es einen gewissen Parallelismus zwischen der Konzentration des Blutes an OH-

¹⁾ Henderson, *Ergebn. d. Physiol.* 8, 254, 1909.

und H-Ionen und seinem Kohlensäuregehalt (unter den oben angeführten Bedingungen) gibt.

Wir heben diese Dinge hier etwas ausführlicher hervor, da gerade in neuester Zeit von Rolly¹⁾, scheinbar ohne Kenntnis der Arbeit Hendersons, prinzipielle, zum Teil schon von Henderson besprochene Einwände gegen die Kohlensäuremethode erhoben werden. Einen Teil der Einwände wird man gelten lassen. Auch Rolly betont die Unzuverlässigkeit von Alkaleszenzbestimmungen im Blute einer oberflächlichen Körpervene, er hebt den Anteil der Ventilation der Lunge und der veränderten CO₂-Produktion hervor. Außerdem glaubt er aber, daß durch den Übergang von Mono- zu Bicarbonat im Blute, der sich im Lungenkreislauf vollziehen soll, die Verhältnisse ganz unübersichtlich werden, und die Kohlensäuremethode, auch abgesehen von den oben erwähnten Einwänden, prinzipiell unrichtige Werte geben muß. Dem ist aber mit Henderson entgegenzuhalten, daß sich im Blute freie Kohlensäure und Natriumbicarbonat findet, nicht aber Mononatriumcarbonat, wie früher angenommen wurde.

Theoretisch müßten also die Resultate der physikalisch-chemischen Untersuchung des Blutes und der Kohlensäuremethode parallel gehen. Nach Rolly — er führt mancherlei Beispiele in seinen Protokollen an — tun sie es nicht oder doch nicht regelmäßig. Oft findet man eine Änderung, besonders eine Abnahme der CO₂, ohne entsprechende Änderung der Ionenkonzentration, z. B. bei experimentellen Vergiftungen usw. Wir glauben, man muß die Ursache hierzu nicht in prinzipiellen Fehlern der Kohlensäuremethode als solcher suchen, sondern eher unter den Einwänden, die auch trotz der Ausführungen Hendersons gegen die Kohlensäuremethode bestehen bleiben, z. B. Überventilation, Änderung der Kohlensäurebildung, ungleichmäßige Zusammensetzung des Blutes verschiedener Gefäßgebiete.

Ein Teil dieser Schwierigkeiten wird durch Bestimmung der Kohlensäurespannung in der Alveolarluft umgangen. Zuntz, Haldane u. a. haben nachgewiesen, daß die Alveolarluft mit den Blutgasen in Spannungsgleichgewicht steht. Die

¹⁾ Rolly, Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilkunde, Festschrift für Strümpell 47/48, 617, 1918.

Anschaung Bohrs von der Gassekretion in der Lunge muß jetzt wohl definitiv fallen gelassen werden, besonders auf Grund der Versuche von Krogh¹⁾. Seitdem nun durch Haldane und Priestley²⁾, später durch Plesch³⁾ Methoden zur direkten Bestimmung der Alveolarluft angegeben wurden, sind zahlreiche Untersuchungen über die Alkaleszenz des Blutes mit dieser Methodik ausgeführt worden. Verminderte Kohlensäurespannung der Alveolarluft spricht für Verminderung der Alkaleszenz des arteriellen Blutes und somit für vermehrte Produktion von Säuren im Organismus. In der Tat haben auch Haldane und seine Mitarbeiter, ferner Porges, Leimdörfer und Markovici⁴⁾, Straub und Schlayer⁵⁾, Siebeck⁶⁾ u. a. mit den von Haldane oder Plesch angegebenen Methoden eine Herabsetzung der alveolaren Kohlensäurespannung gefunden, und zwar bei solchen Zuständen, bei denen man auch aus anderen Gründen eine vermehrte Säurebildung schon früher angenommen hatte: Verminderung der Sauerstoffzufuhr, diabetische Acidose, Urämie, dekompensierte Herzkrankheiten, sie alle zeigen mehr oder weniger ausgesprochen die Erscheinungen einer verminderten Kohlensäurespannung in den Alveolen. Ja, sogar die relativ geringe Entziehung saurer Valenzen, die während der Magenverdauung erfolgt, macht sich bereits durch Heraufgehen der Kohlensäurespannung bemerkbar. Bezüglich der schon sehr ausgedehnten Literatur über diesen Gegenstand verweisen wir auf die zusammenfassende Darstellung von Douglas⁷⁾, in der besonders die grundlegenden englischen Arbeiten eingehend besprochen sind.

Ohne Zweifel ist das Verfahren von Haldane dem älteren von Walter und Hans Meyer weit überlegen. Einige der oben erwähnten Einwände gegen die Kohlensäuremethode fallen bei dem Haldaneschen Verfahren fort. Besonders der

¹⁾ Krogh, Skandin. Arch. f. Physiol. 23, 1911.

²⁾ Haldane und Priestley, Journ. of Physiol. 32, 225, 1905.

³⁾ Plesch, Hämodynamische Studien. Berlin, Hirschwald 1909.

⁴⁾ Porges, Leimdörfer und Markovici, Zeitschr. f. klin. Med. 73, 1911 und 77, 446.

⁵⁾ Straub und Schlayer, Münch. med. Wochenschr. 1912, 569.

⁶⁾ Siebeck, Arch. f. klin. Med. 107, 252.

⁷⁾ Douglas, Ergebn. d. Physiol. 14, 338.

Einwand, daß nicht immer gleichmäßig zusammengesetztes Blut untersucht wird, wenn man eine einzelne Körpervene zur Blutentnahme benutzt.

Aber auch gegen die Alveolarluftbestimmung als Maß der Blutalkalescenz sind gerade in letzter Zeit wieder neue Bedenken aufgetaucht. Hasselbalch¹⁾ hat gezeigt, daß die Kohlensäuretension der Alveolarluft nur dann als Maß der Blutalkalescenz gelten darf, wenn das Atemzentrum immer den gleichen Grad von Erregbarkeit besitzt. Das ergibt sich auch schon aus den Erörterungen Hendersons. Nur dann, wenn der regulierende Mechanismus ungeändert bleibt, kann man überhaupt aus dem Kohlensäuregehalt der Alveolen oder des Blutes weitergehende Schlüsse ziehen. Hasselbalch glaubt nun, auch auf Grund der Untersuchungen mit Lindhard²⁾, daß Änderungen der Erregbarkeit des Atemzentrums häufiger vorkommen, als man bisher annahm. Wenn das der Fall wäre, würde natürlich das Haldanesche Gesetz viel an Wert verlieren. Eine Verminderung der alveolaren Kohlensäurespannung könnte dann ebensogut durch Säurebildung im Organismus, wie durch Erhöhung der Anspruchsfähigkeit des Atemzentrums entstehen. Porges³⁾ hat kürzlich versucht, die Einwände von Hasselbalch zu widerlegen. Er erklärt die Befunde der dänischen Forscher aus der Verwendung einer ungeeigneten Methode. Man kann aber bisher nicht sagen, wie weit den Einwänden Hasselbalchs nicht doch eine gewisse Berechtigung zukommt. Dafür spricht scheinbar eine schon von Haldane gefundene Tatsache: Die alveolare Kohlensäurespannung verschiedener, ganz normaler Individuen zeigt bisweilen recht große und konstante Differenzen. Auch Siebeck und der eine⁴⁾ von uns konnten sich seinerzeit von dieser Erscheinung überzeugen: die alveolare Kohlensäurespannung des einen Mitarbeiters war dauernd um etwa 20⁰/₁₀₀ höher als die des andern, und zwar unter möglichst gleichen Bedingungen. Man könnte in dieser Erscheinung vielleicht den Ausdruck einer

¹⁾ Hasselbalch und Lindhard, *Skandinav. Arch. f. Physiol.* 25, 361, 1911.

²⁾ Lindhard, *Journ. of Physiol.* 37, 337, 1911.

³⁾ Porges, *diese Zeitschr.* 54, 1913.

⁴⁾ Morawitz und Siebeck, *Arch. f. klin. Med.* 97, 201.

individuell verschiedenen Erregbarkeit des Atemzentrums sehen. Jedenfalls scheint diese Erklärung ebenso sehr möglich, als die Annahme eines abnormen Stoffwechsels, einer Acidose, bei Menschen mit besonders geringer Kohlensäurespannung in den Alveolen. Es wäre wohl notwendig, diese Fragen genauer zu untersuchen und die alveolare Kohlensäurespannung mit einer anderen Methode zu kontrollieren. Für die Praxis ergibt sich aber aus diesen scheinbar sehr häufigen Differenzen der normalen Kohlensäurespannung folgendes: Da man bei Kranken in der Regel normale Alveolarluft im kompensierten Zustande nicht untersuchen kann, wird man niedrigere Werte, wenn sie nicht sehr erheblich sind, nicht mit Sicherheit als Zeichen einer Acidose ansehen dürfen. Denn es könnte sich ganz wohl um einen Menschen handeln, dessen alveolare Kohlensäurespannung auch schon unter normalen Verhältnissen niedrig ist. Trotzdem ist aber gern zuzugeben, daß Einwänden dieser Art keine ausschlaggebende Bedeutung zukommt. Auch läßt sich zur Zeit schwer übersehen, ob wirklich, wie Hasselbalch vermutet, schnelle und erhebliche Änderungen der Erregbarkeit des Atemzentrums häufig vorkommen und Bedeutung haben. Wir möchten ihre Bedeutung nicht sehr hoch veranschlagen.

Wichtiger sind gewisse Bedenken, die sich gegen die Methode der alveolaren Kohlensäurebestimmung aus den Untersuchungen Siebecks (l. c.) ergeben. Die Methode setzt natürlich voraus, daß es eine Alveolarluft von konstanter Zusammensetzung gibt, daß also in den Alveolen der ganzen Lunge die Luft den gleichen Kohlensäuregehalt hat. Das dürfte auch für den normalen Menschen sowie für eine gewisse Zahl pathologischer Fälle zutreffen. Nun ergibt sich aber aus den Beobachtungen Siebecks, daß bei Respirations- und Zirkulationsstörungen bisweilen infolge ungenügender und ungleichmäßiger Atmung überhaupt keine gleichmäßig zusammengesetzte Alveolarluft besteht. Dieser Befund erscheint uns sehr beachtenswert und in ihm möchten wir einen viel schwerwiegenden Einwand gegen die Methodik sehen, als in den Versuchen Hasselbalchs. Soviel wir sehen können, scheinen die Versuche Siebecks außer von Rolly noch von niemand gebührend berücksichtigt zu sein. Und doch kann die Methodik der Alveolarluftbestimmung nur dann richtig verwertet werden, wenn

man erkennt, welche Fälle überhaupt diesem Verfahren zugänglich sind. Sonst findet man Acidosen dort, wo sie überhaupt nicht bestehen. Unzweifelhaft ist das schon mehrfach vorgekommen.

Es scheint uns daher erwünscht, die Kohlensäuremethode nach einer anderen Richtung zu ergänzen und einwandfreier zu gestalten. Das im folgenden beschriebene Verfahren soll diesem Zwecke dienen. Es ist vorwiegend für Untersuchung des arteriellen Blutes von Tieren ausgearbeitet. Denn die Methode der Alveolarluftbestimmung ist in der Technik Haldanes im Tierversuch überhaupt nicht verwendbar, in der von Plesch nur bei größeren Tieren, von denen man genügende Gasmengen gewinnen kann. Über die Bestimmung der Kohlensäure nach Martin Hahn und Heim¹⁾ in sehr kleinen Mengen Gasmengen mittels des Interferometers fehlen noch ausreichende Erfahrungen.

Das Prinzip des hier beschriebenen Verfahrens ist ein aerotonometrisches. Blut wird unter bestimmten Bedingungen mit einer Gasmischung von bekanntem und konstantem Kohlensäuregehalt geschüttelt. Es folgt dann die Bestimmung der Kohlensäuremenge in einer kleinen, abgemessenen Blutprobe.

Zur Begründung des Verfahrens genügen einige kurze Bemerkungen, um so mehr, als ähnliche tonometrische Bestimmungen schon vielfach ausgeführt worden sind, allerdings mit komplizierterer Methodik. Vor vielen Jahren schon hat C. Lehmann²⁾ einige Beobachtungen gemacht, die hierher gehören. Er schüttelte Blut mit einer Kohlensäureatmosphäre, die 26,9% Kohlensäure enthielt, und verglich die durch die Kohlensäureaufnahme bestimmten Alkaleszenzwerte des Blutes mit denen der Weinsäuretitration. Die Werte differierten oft. Lehmann nimmt an, daß bei dem titrierten Blut säurebindende Valenzen aus den Blutzellen austreten und dadurch zu hohe Alkaleszenzwerte zustande kommen. In sehr eingehender Weise hat dann Jaquet³⁾ mit kompliziert gebauten Absorptionstonometern die Frage untersucht, wie sich die Absorption der Kohlensäure

¹⁾ Martin Hahn und Heim, Berl. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 5.

²⁾ C. Lehmann, Arch. f. d. ges. Physiol. 58, 462.

³⁾ Jaquet, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 30, 313, 1892.

bei titrimetrisch gleichen Blutproben gestaltet. Loewy und Münzer¹⁾ studierten dasselbe Problem bei experimenteller Säurevergiftung. Sie finden, daß die Waltersche Methode zu niedrige Werte gibt, da das Blut der vergifteten Tiere sehr wohl imstande ist, aus einer Atmosphäre mit bestimmtem Kohlensäuregehalt Kohlensäure aufzunehmen. In Übereinstimmung mit den älteren Befunden C. Lehmanns finden A. Loewy und Münzer eine auffallend geringe Änderung der titrimetrisch bestimmten Alkaleszenz bei Säurevergiftung, während die Aufnahmefähigkeit des Blutes für Kohlensäure viel stärker herabgesetzt erscheint. Am stärksten alkalisch ist aber das Blut bei direkter Bestimmung der Kohlensäure nach Walter. In ähnlicher Weise macht Cohnstein²⁾ auf die Differenzen zwischen titrierter Alkaleszenz und Kohlensäurebestimmung nach Walter aufmerksam. Bei der Peptonvergiftung ist nach seinen Untersuchungen die Kohlensäure stark vermindert, mit der Titration findet man keine Alkaleszenzabnahme.

Aerotonometrische Bestimmungen der Kohlensäure sind also schon mehrfach zu Zwecken der Alkaleszenzbestimmungen herangezogen worden. Als Hauptresultat hat sich ergeben, daß die Befunde mit denen der Walterschen Methode sehr oft nicht übereinstimmen.

II. Methode.

Es sei gestattet, im folgenden zunächst das relativ einfache Verfahren unserer tonometrischen Methode zu schildern:

3 bis 5 ccm Blut werden der Arterie des ruhenden Tieres durch eine trockene Glaskanüle entnommen und in einer sauberen, trockenen Porzellanschale aufgenommen. Die Gerinnung wird durch Zusatz einiger Körnchen neutralen Natriumoxalats verhindert. Bei einiger Übung gelingt es leicht, die eben notwendige Menge Natriumoxalat abzuschätzen. Eine Konzentration von 0,2 bis 0,3% im Blute ist ausreichend. Zu viel Natriumoxalat ist zu vermeiden.

Menschliches Blut kann aus der Armvene entnommen werden. Mäßige Stauung scheint die Resultate nicht zu beeinflussen, wohl aber Bewegungen, besonders solche des Armes.

¹⁾ Loewy und Münzer, *Arch. f. (Anat. u.) Physiol.* 1901, 81 u. 174.

²⁾ Cohnstein, *Virchows Archiv* 130.

Normalwerte kann man nur bei Ruhe erhalten. Davon wird später noch gesprochen werden. Die Blutentnahme hat mit sauberen, trocknen Luerschen oder Rekordspritzen zu geschehen. Noch besser ist es, 5 ccm Blut direkt aus der eingestochenen Nadel in die Porzellanschale tropfen zu lassen. Berührung mit der atmosphärischen Luft ist ohne Bedeutung.

Schon vor der Blutentnahme ist das Aerotonometer vorbereitet worden. Es besteht (Fig. 1) aus einer etwa 250 ccm fassenden Glasflasche von länglicher Form, deren Boden etwas konisch ausgezogen ist. Die Flasche soll aus alkali-freiem Glase hergestellt sein und vor Beginn einer Versuchsreihe ausgedämpft werden¹⁾. Sie ist durch einen 3fach durchbohrten Gummipfropfen ver-

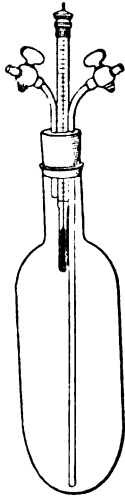


Fig. 1.

schlossen. In die eine Bohrung ist luftdicht ein Thermometer eingelassen, das Ablesungen im Bereich von 35 bis 45° zuläßt. Ein gewöhnliches Fieberthermometer genügt. Die beiden anderen Bohrungen sind für zwei Neusilberkanülen bestimmt, von denen die eine lang, die andere nur kurz ist; die längere der Röhren reicht bis nahezu auf den Boden des als Aerotonometer dienenden Glasgefäßes, die kürzere endigt im Innern des Gefäßes. Beide Röhren sind an ihrem oberen Ende durch je einen fest schließenden Neusilberhahn verschlossen. Die äußeren Enden der beiden Kanülen werden mit je einem kurzen, derben Druckschlauch mit sehr engem Lumen versehen. (Letzteres auf der Abbildung fortgelassen.)

Das Aerotonometer ist, wie Fig. 2 zeigt, von einer Thermosflasche umgeben. Diese enthält Wasser von 38 bis 39°. Nur der Gummistopfen mit Thermometerskala und Hähnen ragt aus der Thermosflasche hervor.

Vor Beginn des Versuchs wird das Tonometer mit der kohlenensäurehaltigen Gasmischung gefüllt. Als Gasometer diente die in Fig. 3 abgebildete geeichte Glasflasche A, die 1400 ccm Luft faßt. Die Flasche ist bis zu einem beliebigen Niveau mit Luft gefüllt und kommuniziert mit der Glaskugel B, die

¹⁾ Die Flaschen wurden uns von Glasbläser Kramer-Freiburg hergestellt.

Schwefelsäurewasser enthält, das als Sperrflüssigkeit dient. Die Kohlensäure wird aus einem Kippschen Apparat entwickelt und mit konz. Schwefelsäure gereinigt. Die Abmessung der Kohlensäure geschieht mit einer Hempelschen Gasbürette. Die gewünschte Menge wird in gewöhnlicher Weise quantitativ in das Gasometer übergeführt. Dann saugt man durch Senken der Kugel *B* bis zu einer bestimmten Marke Luft in das

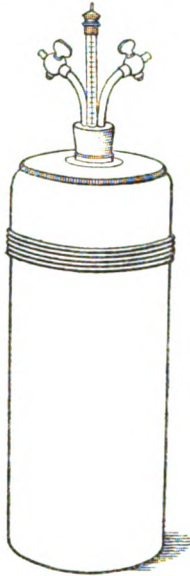


Fig. 2.

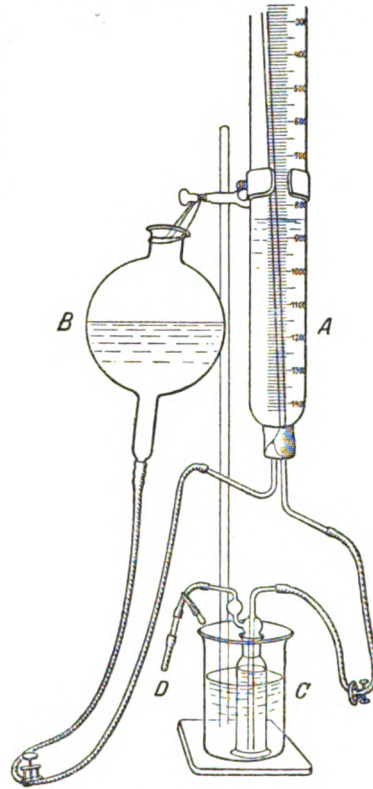


Fig. 3.

Gasometer nach und sorgt durch Bewegen von *A* für gleichmäßige Mischung der Kohlensäure.

Die einmal hergestellte Gasmischung genügt für eine größere Anzahl von Bestimmungen. Das kleine Gasometer ist dem von Zuntz und Loewy¹⁾ verwendeten nachgebildet.

Die Füllung des Tonometers mit der Gasmischung geschieht in folgender Weise: Das Aerotonometer wird von einer der Röhren aus durch eine Wasserstrahl- oder Handpumpe

¹⁾ Zuntz und Loewy, Arch. f. d. ges. Physiol. 58, 511.

evakuiert. Das Vakuum muß stets gleich sein. Wir wählen immer Evakuierung bis 20 mm Hg. Ist dieser Punkt erreicht, dann wird das Aerotonometer durch Drehung des Hahnes verschlossen und ist zur Aufnahme der Gasmischung bereit.

Diese wird durch Heben der Kugel *B* aus dem Gasometer ausgetrieben. Dabei passiert die Gasmischung eine kleine Waschflasche, die mit Wasser von 37° gefüllt ist (*C*). Hierdurch soll eine Sättigung des Gases mit Wasserdampf bei 37° erreicht werden. Man läßt durch *D* 100 bis 200 ccm der Gasmischung abströmen, bis alle Luft sicher aus dem ganzen Röhrensystem verdrängt ist, und schließt dann bei *D* die eine Kanüle des evakuierten Aerotonometers an. Durch vorsichtiges Öffnen des Hahnes am Aerotonometer läßt man sodann das Gas langsam in dieses eintreten und sorgt für Druckausgleich, indem man in *A* und *B* gleiches Niveau herstellt.

Dann wird das Tonometer wieder verschlossen, ebenso das Gasometer *A*, dessen Inhalt für weitere Versuche dienen kann.

Wir haben dann also im Aerotonometer stets eine kleine Menge Luft. Diese bleibt für alle Versuche die gleiche, da immer ein gleiches Vakuum hergestellt wird. Daneben eine größere Kohlensäureluftmischung, die immer von der gleichen Kohlensäurespannung ist. Nur wenn diese Bedingungen erfüllt sind, kann man vergleichende Versuche mit hinreichender Genauigkeit ausführen. Die Gase im Tonometer besitzen ungefähr Körpertemperatur und sind bei 37° mit Wasserdampf gesättigt.

An sich kommt es nicht sehr darauf an, wie stark der Partiardruck der Kohlensäure im Tonometer ist. Er muß nur stets der gleiche sein. Aus praktischen Gründen empfiehlt sich aber nicht, mit zu hohen Kohlensäurespannungen zu arbeiten, wie es Lehmann getan hat. Denn erstens flacht sich die Spannungskurve der Kohlensäure bei großen Kohlensäuremengen sehr stark ab, und zweitens ist es gewiß am richtigsten, mit derjenigen Kohlensäurespannung zu arbeiten, die man etwa im Blute zu erwarten hat. Und das ist die normale alveolare Kohlensäurespannung. So wird man den im Organismus wirksamen Faktoren am ehesten nahekommen. Zu bedenken ist auch, daß bei sehr hohen Kohlensäurespannungen die Werte durch Ionenaustausch zwischen Plasma und Blutzellen verschoben werden können.

Es dürfte daher am zweckmäßigsten sein, mit einer 5⁰/₀igen Kohlensäuremischung zu arbeiten. Wir haben aber die ersten Versuchsreihen mit einer 3,57⁰/₀igen Kohlensäuremischung begonnen, und sind später dabei geblieben, um eine genügende Zahl vergleichender Versuche zu erhalten. Für spätere Untersuchungen würde sich aber eine 5 bis 6⁰/₀ige Mischung empfehlen.

Nach Füllung des Aerotonometers wird das Blut mittels einer trockenen Luer-Spritze durch das kurze Rohr in das Tonometer eingespritzt. Man läßt nun den jetzt entstandenen Überdruck durch kurzes Öffnen des einen Hahnes aus dem Aerotonometer ab und beginnt den ganzen Apparat kräftig zu schütteln, wobei man von Zeit zu Zeit auf das Thermometer blickt. Wir haben unsere Versuche durchweg bei einer Temperatur von 36 bis 38° ausgeführt. Hat man einige Übung, so kann man leicht dem Wasser in der Thermosflasche die Temperatur geben, die nötig ist, Blut und Gasmischung auf 36 bis 37° zu erwärmen. Man braucht dafür meist etwa 39°, wenn man für vorherige Erwärmung der Flasche und des Röhrensystems sorgt. Diese Erwärmung kann im Brutschrank geschehen.

Das Blut wird nun 10 Minuten lang mit der Kohlensäuremischung geschüttelt. Das Schütteln geschieht manuell, da der Apparat in der Schüttelmaschine Not leiden kann. Es ist sicher anzunehmen, daß in einer Zeit von 10 Minuten vollständiger Spannungsausgleich zwischen Blut und Gasmischung eingetreten ist. Jedenfalls sprechen die Erfahrungen von Bohr, Krogh u. a. dafür, daß der Spannungsausgleich der Kohlensäure in dieser Zeit vollendet sein muß.

Die im System herrschende Temperatur bleibt während dieser Zeit hinreichend konstant. Darüber unterrichtet folgender Versuch, der mit dem in der Thermosflasche stehenden, nicht geschüttelten Aerotonometer ausgeführt wurde.

Zimmertemperatur 24°.

Im Aerotonometer	6 Std.	9 Min.	. .	36,05°
	6 "	10 "	. .	36,01°
	6 "	13 "	. .	36,01°
	6 "	15 "	. .	36,00°
	6 "	19 "	. .	35,09°

Nach 10 Minuten langem Schütteln, das keineswegs besonders intensiv zu sein braucht und durch Pausen unterbrochen werden

kann, wird dem Aerotonometer eine Blutprobe zur Kohlensäurebestimmung entnommen. Die Entnahme geschieht durch das lange, bis auf den Boden des Aerotonometers reichende Neusilberrohr mittels einer langen, genau graduierten Pipette, die durch eine kurze, fest anschließende Druckschlauchverbindung an das obere Ende des Rohres angesetzt wird. Man saugt mit dem Munde an und entnimmt 2 ccm, die nun sofort, und ohne mit der Luft in Kontakt zu treten, zur Kohlensäureanalyse dienen.

Hierzu dienten die Barcroft-Haldaneschen Apparate mit Wassermanometer. Bezüglich der Technik der Kohlensäurebestimmung sei auf die Abhandlung Barcrofts¹⁾ verwiesen. Zu jeder Bestimmung verwandten wir je 1 ccm Blut. Fast immer haben wir Doppelbestimmungen ausgeführt, die meist gute Übereinstimmung ergaben. Versuche, in denen sich mehr als 5% Fehler finden, sind unbrauchbar.

Folgende technische Bemerkungen sind noch hinzuzufügen: Das Aerotonometer muß absolut dicht sein und von Zeit zu Zeit bei stark negativem Druck auf seine Dichtigkeit geprüft werden. Undichtigkeiten kommen am häufigsten an den Hähnen vor, ferner an der Bohrung des Gummistopfens.

Man hat ferner darauf zu achten, daß die lange Neusilberöhre wirklich den tiefsten Teil der als Tonometer dienenden Flasche erreicht. Denn nur dann gelingt es, die 2 ccm Blut zur Analyse zu entnehmen, da man ja nur mit 3 bis 5 ccm Blut arbeiten soll und größere Blutmengen Fehler veranlassen können. Davon später noch mehr.

Natürlich müssen auch sämtliche Gläser und Röhren, die mit dem Blute in Berührung kommen, absolut sauber und trocken sein. Die Neusilberöhren reinigt man am besten mit der Wasserstrahlpumpe. Destilliertes Wasser, Alkohol und Äther werden durchgesaugt. Dann ein Luftstrom zum Trocknen. Bis zum nächsten Versuche werden Flasche und Röhren in den Thermostaten gelegt.

Im Anfang macht es auch Schwierigkeiten, die Temperatur des Wassers in der Thermosflasche richtig zu bemessen. Man erleichtert sich die Herstellung der Körpertemperatur, wenn man Glasflaschen und Röhren bis zu Beginn des Versuches im Thermostaten liegen läßt.

Endlich kann es leicht vorkommen, daß man beim Ansaugen des Blutes zur Analyse Gasblasen in die Pipette bekommt. Das geschieht immer dann, wenn die Verbindung zwischen Pipette und Neusilberrohr nicht völlig dicht ist. Man stellt am besten diese Verbindung mittels eines Druckschlauches von sehr engem Lumen her.

¹⁾ Barcroft, *Ergebn. d. Physiol.* 7, 699, 1908.

III. Vorteile der Methode.

Das hier beschriebene Verfahren bietet gegenüber der einfachen Kohlensäurebestimmung im arteriellen Blute, also gegenüber der Walterschen Methode, sicher erhebliche Vorteile. Erstens ist man ganz unabhängig von der Atemmechanik, es ist gleichgültig, ob der Mensch oder das Versuchstier ihre Lungen übermäßig ventilieren. Es wird ja nicht die Menge der Kohlensäure schlechthin bestimmt, die eine Blutprobe enthält, sondern die Menge, die Blut bei bekannter Kohlensäurespannung aufzunehmen vermag. Das Verfahren bietet den weiteren Vorteil, daß man von der Kohlensäurebildung im Organismus ebenfalls ganz unabhängig ist. Diese scheint bei manchen Zuständen, besonders Vergiftungen (Kohlenoxydvergiftung), nicht unerheblich zu schwanken.

Die Methode teilt mit der Walterschen den Vorzug der großen Ausschläge, der sicher nicht unterschätzt werden darf und den auch Henderson hervorhebt.

Die Einwände, die man mit größerer oder geringerer Berechtigung gegen die alveolare Kohlensäurebestimmung erhoben hat, treffen unsere Methode nicht. Erregbarkeitsänderungen des Atemzentrums sind ohne Belang, ebensowenig ist es von Bedeutung, ob überhaupt im engeren Sinne eine Alveolarluft vorhanden, oder ob die Gasmischung in der Lunge ungleichmäßig ist, wie es Siebeck für manche pathologischen Fälle nachgewiesen hat.

Für den Tierversuch, bei dem man arterielles Blut untersuchen kann, ist die hier beschriebene tonometrische Methode der Alveolarluftbestimmung sicher vorzuziehen, weil diese ja überhaupt nur mit Schwierigkeiten bei Tieren anzuwenden ist und speziell bei kleineren Tieren versagt. Auch kann man wohl annehmen, daß alle Manipulationen, die z. B. bei der hier allein in Betracht kommenden Methode von Plesch notwendig sind, schon recht erhebliche Änderungen in der Atemmechanik herbeiführen können. Wie groß die Fehler durch solche Atemänderungen sein können, ergibt sich aus den zahlreichen Untersuchungen mit dem Zuntz-Geppertschen Respirationsapparat. In kurzdauernden Versuchen erhält man bisweilen unrichtige respiratorische Quotienten, die vermutlich

wohl auf einer Änderung der Atemmechanik beruhen [Rolly¹⁾, Grafe²⁾].

Für Versuche am Menschen möchten wir, trotz aller Bedenken, der Alveolarluftmethode den Vorzug vor unserer Methode geben. Hauptsächlich deswegen, weil man kein arterielles Blut untersuchen kann. Untersuchungen am Venenblut des Armes sind gewiß auch nicht wertlos, aber doch immer unsicher. Man weiß ja nie genau, ob das arterielle Blut, das dem Atemzentrum zuströmt, dieselben Veränderungen zeigt, wie das Blut eines kleinen venösen Gebiets. Lokale Säuerungen des Blutes kommen sicher vor, am Arm z. B. bei kräftiger Muskularbeit. Davon geben wir später einige Beispiele. Die Methode von Hürter³⁾ gestattet es allerdings, auch arterielles menschliches Blut zu gewinnen, doch fehlt uns über diese Methode eigene Erfahrung.

Ein Vorteil der tonometrischen Methode vor der alveolaren Kohlensäurebestimmung liegt in den quantitativ viel größeren Ausschlägen.

Diesen Vorteil hat das Verfahren auch unzweifelhaft vor der Bestimmung der aktuellen Reaktion mit Hilfe der Gasketten voraus, für die Rolly eintritt. Es ist allerdings richtig, daß die meisten Physiologen mehr oder weniger der Ansicht zuneigen, die Erregung des Atemzentrums sei eine Funktion der H-Ionenkonzentration des Blutes. Man vergleiche hierzu die Ausführungen von Douglas. Dieser Autor weist aber gleichzeitig darauf hin, daß ganz minimale Änderungen der Ionenkonzentration die ausgesprochensten biologischen Wirkungen haben müßten, wenn man wirklich alle Erregungen des Atemzentrums nur auf die Konzentration der H-Ionen zurückführen will. Man kann nämlich nach Douglas bisweilen mit der Kohlensäurebestimmung in der Alveolarluft auch schon Säuerungen nachweisen, wenn die physikalisch-chemische Methode noch keine Änderungen ergibt. Die Genauigkeit dieses Verfahrens ist eben auch keine absolute, worauf Hasselbalch hingewiesen hat, ebenso Rolly. Endlich werden die physikalisch-

¹⁾ Rolly und Meltzer, *Deutsch. Arch. f. klin. Med.* 97, 274.

²⁾ Grafe, *ebenda* 101, 209.

³⁾ Hürter, *ebenda* 108, 1912, S.-A.

chemischen Bestimmungen ja auch nicht am arteriellen Blute ausgeführt, soweit wenigstens der Mensch in Frage kommt.

So sehr wir die theoretischen Vorzüge der Bestimmung der aktuellen Reaktion anerkennen, so glauben wir doch, daß für biologische Zwecke eine der beiden Kohlensäuremethoden vorzuziehen ist. Denn trotz ihrer unzweifelhaft größeren Fehler geben diese Methoden feinere Ausschläge als die physikalisch-chemischen, nämlich jene, die man zur Beurteilung biologischer Probleme braucht.

Woher kommt es sonst, daß Rolly bei der Urämie sehr oft, bei der diabetischen Acidose mehrfach eine Säuerung des Blutes vermißte? Wohl nicht, weil überhaupt keine Säuerung bestand, sondern wohl nur deswegen, weil die Steigerung der H-Ionenkonzentration in der von ihm untersuchten Blutprobe (kein arterielles Blut!) sich durch ihre Geringfügigkeit dem Nachweise entzog. Wir möchten auf Grund seiner Befunde die Resultate der Kohlensäuremethoden, die gerade bei diesen Zuständen in seltener Übereinstimmung eine Herabsetzung der Alkaleszenz erkennen lassen, noch keineswegs für unrichtig halten.

IV. Fehlerquellen der tonometrischen Methode.

Abgesehen von den vermeidbaren Fehlern bietet die Methodik als solche folgende Fehlermöglichkeiten:

Die Analyse der Kohlensäure in nur 1 ccm Blut arbeitet nach den Ermittlungen Barcrofts mit einem Maximalfehler von etwa 5%. Doppelbestimmungen können diesen Fehler vielleicht etwas herabdrücken. Bei den großen Ausschlägen, mit denen man bei dieser Methode zu rechnen hat, ist aber auch ein Fehler von 5% nicht als hoch anzusehen. Es wäre natürlich möglich, durch Anwendung einer exakteren Methode der Kohlensäurebestimmung den Fehler zu verkleinern. Immerhin sind die anderen Verfahren zur Bestimmung kleiner Kohlensäuremengen recht kompliziert, sie würden die Durchführung eines Versuches verzögern. Alles, was für biologische Zwecke Interesse hat, wird, soviel wir sehen können, auch durch die einfache und sehr bequeme Art der Kohlensäurebestimmung erreicht.

Ein weiterer Fehler könnte durch Temperaturschwankungen während des Schüttelns entstehen. Daß die Schwankungen nur sehr gering sind und im Verlaufe von 10 Minuten 0,2°

nicht zu übersteigen brauchen, ist oben gezeigt worden. Voraussetzung dafür ist allerdings gute Schlußfähigkeit des Korkes, der den Thermos nach oben abschließt. Während des Schüttelns beobachtet man meist, daß die anfangs niedrige Temperatur (unter 36°) auf den gewünschten Wert zwischen 36 und 37° steigt. Es liegt das wohl daran, daß vor dem Schütteln noch kein absoluter Temperatúrausgleich im Tonometer zustande gekommen ist und die erwärmten Randschichten noch nicht bis zu dem zentral schwebenden Quecksilbergefäß des Thermometers gedrungen waren.

Nach dem, was man über den Einfluß der Temperatur auf die Spannungskurve im Blute weiß — es sei auf die Abhandlung von Bohr¹⁾ und A. Loewy²⁾ aufmerksam gemacht — sind diese geringen Temperaturschwankungen ganz bedeutungslos.

Wichtiger ist folgende Fehlermöglichkeit: Man schüttelt Blut im Tonometer mit einer relativ geringen Gasmenge, nämlich 250 ccm.

Es ist denkbar, daß Schwankungen im ursprünglichen Kohlensäuregehalt des Blutes sich gegenüber einer so geringen Gasmenge geltend machen können. Bei einem kohlenstoffreichen Blute würde man trotz gleicher Alkaleszenz doch höhere Werte erhalten, als bei einem ursprünglich kohlenstoffarmen. Die Menge der Kohlensäure im Blute könnte also vielleicht quantitativ in Betracht kommen und nicht ganz vernachlässigt werden dürfen. Man arbeitet dann mit Gasmischungen von wechselndem und nicht von gleichem Kohlensäuregehalt. Dadurch müssen die Resultate unsicher werden.

Der Einwand ist theoretisch unzweifelhaft richtig. Es fragt sich nur, wie weit ihm in Wirklichkeit eine Bedeutung zukommt. Bei einer 5%igen Kohlensäuremischung haben wir in der Flasche 12 bis 13 ccm Kohlensäure. Der Kohlensäuregehalt in 4 ccm Blut kann von etwa 0,4 bis 2,4 ccm schwanken, wenn wir die extremen Werte berücksichtigen. Es ist klar, daß es nicht gleichgültig sein kann, ob sich einer Atmosphäre von 13 ccm Kohlensäure 0,4 oder 2,4 ccm beimischen.

Man darf aber nicht vergessen, daß die Kohlensäurespannung der Gasmischung schon von vornherein so gewählt

¹⁾ Bohr, Blutgase und respiratorischer Gaswechsel. Nagels Handb. d. Physiol. 1, I, 54.

²⁾ A. Loewy, Die Gase des Körpers. Handb. d. Biochem. 4.

ist, daß sie etwa der des normalen Blutes entspricht. Daher wird der Gasaustausch zwischen Blut und Atmosphäre selbst unter ziemlich ungünstigen Bedingungen nur ein relativ unbedeutender sein, sei es, daß das Blut Kohlensäure abgibt oder aufnimmt. Meist dürfte es sich wohl nur um wenige $\frac{1}{10}$ ccm handeln, besonders dann, wenn man arterielles und nicht gestautes Venenblut verwendet. Aber auch im letzteren Falle entsteht, wie auch die Erfahrung zeigt, kein praktisch wahrnehmbarer Fehler.

Das beweisen folgende Versuche, von denen hier nur einige wiedergegeben werden: Menschliches Blut wird durch Punktion der gestauten Armvene entnommen. Die eine Portion gelangt sofort zur Analyse, ohne mit der Luft in Kontakt zu treten, die andere wird vorher an der Luft geschüttelt und dann erst tonometrisch untersucht. Während des Schüttelns mit Luft sank in unseren Versuchen die Kohlensäuremenge im Blute meist von 50 bis 54% auf 25 bis 33%. Der Unterschied war also erheblich. Wenn nun jener oben erwähnte Einwand praktisch bedeutsam wäre, dann müßte der tonometrisch bestimmte Kohlensäuregehalt in der ersten Blutprobe höher ausfallen als in der zweiten.

Die beiden folgenden Versuche unterrichten hierüber.

Versuch 1.

Menschenblut aus der gestauten Vene, in zwei Portionen geteilt und tonometrisch untersucht:

- a) Blutprobe, die noch alle CO_2 enthält . . . 42,6% CO_2
- b) Blutprobe, die durch Schütteln CO_2 -arm
geworden ist 41,9% CO_2
42,3% CO_2

Die Differenzen überschreiten nicht die Fehlergrenzen der Methode.

Versuch 2.

Armvenenblut in derselben Weise vorbehandelt.

- a) CO_2 -reiche Portion 41,1% CO_2
- b) CO_2 -arme Portion 40,0% CO_2

Acht Versuche ergaben stets das gleiche Resultat. Es scheint hiernach, daß der ursprüngliche Kohlensäuregehalt wenig Einfluß auf den Ausfall der tonometrischen Bestimmung hat. Die Differenzen sind immer sehr klein, sie werden um so geringer sein, je weniger Blut man in das Tonometer einführt. Unter 3 bis 4 ccm kann man aber nicht herabgehen, wenn man Doppelbestimmungen mit je 1 ccm machen will.

In den hier ausgeführten Versuchen herrschen besonders ungünstige Bedingungen. Blut von sehr hoher Kohlensäurespannung wird mit solchem von minimaler verglichen. In Wirklichkeit sind so extreme Verhältnisse wohl niemals vorhanden.

Die Methode ist bei einiger Übung leicht zu handhaben. Darin liegt ihr Vorzug vor den bisher angegebenen Verfahren ähnlicher Art, die sich nicht eingeführt haben, da sie zu große technische Schwierigkeiten machen.

V. Versuche.

Untersucht wurde zunächst Venenblut normaler Menschen und Kaninchenblut. Gerade die Untersuchung des Venenblutes zeigt, wie wenig man in der Lage ist, aus irgendwelchen Veränderungen des Kohlensäurebindungsvermögens im Blute einer Gefäßprovinz bindende Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Blutes zu ziehen, das dem Atemzentrum zuströmt.

Das Kohlensäurebindungsvermögen des menschlichen Armvenenblutes schwankt erheblich. Es läßt sich leicht der Nachweis erbringen, daß diese Schwankungen vorwiegend beherrscht werden durch den Zustand der Muskulatur des Armes. Alle Bewegungen der Unterarmmuskeln — sie brauchen nicht einmal sehr angestrengt zu sein — vermindern das Kohlensäurebindungsvermögen, wie die beigegebenen Tabellen zur Genüge zeigen. Es erklärt sich das leicht auf Grund der Vorstellung von Fletcher und Hopkins¹⁾, die gezeigt haben, daß arbeitende Muskeln auch bei normaler Sauerstoff- resp. Blutzufuhr Milchsäure oder ähnliche Substanzen produzieren. Übereinstimmende Werte wird man daher wohl nur erhalten können, wenn man Venenblut untersucht, das unter völlig gleichen Bedingungen gewonnen wurde, wie sie etwa nach längerer völliger Körperruhe bestehen. Schon die geringen Muskelaktionen, die jeder nicht bettlägerige Mensch mit dem Arm ausführt, scheinen zu genügen, das Kohlensäurebindungsvermögen des Blutes zu ändern resp. herabzusetzen.

Die Tabellen I und II unterrichten über das Kohlensäurebindungsvermögen des menschlichen Venenblutes bei Ruhe und Arbeit. Alle Versuche sind an dem einen von uns ausgeführt. Wir geben nur einige Beispiele. Die gesamte Zahl der Versuche am Menschen beträgt etwa 50, von denen 10 wegen mangelhafter Technik ausscheiden. Die Befunde waren auch in den hier nicht wiedergegebenen Versuchen dieselben.

¹⁾ Fletcher und Hopkins, Journ. of Physiol. 35, 296.

Tabelle I.

Versuche an menschlichem Venenblut. Ruhe! Versuchsperson M.

Versuch	Äußere Bedingungen	CO ₂ -Bindungs- vermögen %
1	Ruhe.	47,2 47,4
2	"	46,4 46,1
3	"	46,3 46,7
4	"	46,8
5	Dasselbe Blut wie in Versuch 4, vorher zur Vertreibung der CO ₂ geschüttelt.	47,0 45,4
6	Ruhe.	45,4
7	"	44,6

Tabelle II.

Versuche an menschlichem Venenblut. Muskelanstrengung!
Versuchsperson M.

Versuch	Äußere Bedingungen	CO ₂ -Bindungs- vermögen %
1	Drehen der Zentrifuge. Anspannung der Vorderarmmuskeln.	32,5 32,7
2	Drehen der Zentrifuge, deutliche Ermüdung.	28,5 27,8
3	Drehen der Zentrifuge, deutliches Ermüdungsgefühl.	27,0 26,8
4	Hanteln, bis leichte Ermüdung eintritt.	33,4 34,2
5	Drehen der Zentrifuge.	30,0 29,7

Die beiden kleinen Tabellen zeigen folgendes:

Das Kohlensäurebindungsvermögen im venösen Blute eines nicht bettlägerigen Menschen schwankt in geringen Grenzen. Diese Schwankungen sind — richtige Technik vorausgesetzt — nicht auf die mehr oder minder intensive Stauung des Blutes bei der Entnahme zurückzuführen. Dagegen sprechen die schon früher aufgeführten Vergleichsversuche, die ergeben haben, daß es fast gleichgültig ist, ob man CO₂-reiches oder CO₂-armes Blut mit dem Apparat analysiert. Vielmehr muß man die Schwankungen, soweit sie nicht einfach in die Fehlergrenzen der Me-

thodik fallen, wohl als Ausdruck der wechselnden Zusammensetzung des Venenblutes ansehen. Besonders ist ja natürlich an die Milchsäure zu denken, wobei wir das Wort Milchsäure in demselben Sinne gebrauchen wie Douglas, d. h. als Repräsentant aller jener noch unbekanntes Säuresubstanzen, die sich bei Muskelarbeit oder Sauerstoffmangel bilden. Daß es sich in der Tat um solche Vorgänge handeln muß, geht klar aus der Tabelle II hervor. Schon mäßige Muskelarbeit, wie z. B. das Drehen einer Zentrifuge oder Hantelübungen, setzen das Kohlensäurebindungsvermögen sehr stark herab, und gerade hier ist der große Vorteil unserer Methodik vor manchen anderen klar erkennbar. Es treten nämlich Ausschläge auf, die gänzlich aus dem Bereich der Versuchsfehler herausfallen. Man vergleiche nur die Zahlen der I. und II. Tabelle. Das Kohlensäurebindungsvermögen geht schon bei mäßiger Muskelarbeit um etwa 30 bis 40⁰/₀ zurück. Es ist daher verständlich, daß man auch bei einem Menschen, der nicht intensiv körperlich arbeitet, gewisse kleine Schwankungen finden kann. Allerdings muß man voraussetzen, daß diese Schwankungen im arteriellen Blute viel geringer sein werden. Immerhin glauben wir doch, daß auch die Untersuchung des Venenblutes unter möglichst gleichen Bedingungen, z. B. bei bettlägerigen kranken Menschen, nicht wertlos ist und eine Ergänzung der Methode der Alveolarluftbestimmung bilden kann, besonders dann, wenn die Vermutung besteht, daß bei dem Kranken eine Alveolarluft im engeren Sinne des Wortes überhaupt nicht vorhanden ist (vgl. Siebeck).

Eine zweite Versuchsreihe wurde mit Kaninchenblut ausgeführt, und zwar kamen teils normale Kaninchen zur Untersuchung, teils solche, die Sauerstoffmangel verschiedener Art ausgesetzt waren. Fast durchweg wurde hier das arterielle Blut untersucht, das in der oben beschriebenen Weise aus der Carotis gewonnen wurde. Über die normalen Befunde beim Kaninchen unterrichtet die folgende Arbeit¹⁾. Im allgemeinen ist das Kohlensäurebindungsvermögen niedriger als bei Menschen unter den gleichen Bedingungen und schwankt nach unserer Methode bestimmt etwa zwischen 32 und 38⁰/₀ Kohlensäure. Wir weisen auf die Tabelle in der Arbeit Bieling's. Unter den Be-

¹⁾ Bieling, diese Zeitschr., dieses Heft.

dingungen eines mehr oder weniger extremen Sauerstoffmangels sinkt das Kohlensäurebindungsvermögen des arteriellen Blutes erheblich, z. B. auch bei Sauerstoffmangel durch Anämie. Darüber unterrichtet die folgende Arbeit. Hier seien nur zwei Versuche erwähnt, die erkennen lassen, wie groß die Schwankungen sind, die man unter diesen Bedingungen beobachten kann.

Versuch 1.

Kaninchen, $\frac{1}{2}$ Stunde lang nach Rückenmarksdurchschneidung zu anderen Versuchszwecken in schwerer Asphyxie gehalten. Im Blute findet sich nur wenig Sauerstoff. Unmittelbar nach dem offenbar durch Sauerstoffmangel bedingten Tode Punktion der Vena cava inferior. Kohlensäuregehalt, tonometrisch ermittelt: 16 $\frac{0}{0}$ und 15,45 $\frac{0}{0}$.

Versuch 2.

Kaninchen, ca. 20 Minuten lang unter schwerem Sauerstoffmangel gehalten (Trachealstenose), dann erstickt. Unmittelbar nach dem Tode Blut durch Punktion der unteren Hohlvene gewonnen. Kohlensäure, tonometrisch bestimmt: 20,7 $\frac{0}{0}$.

Diese wenigen Beispiele, die hier gegeben werden — wir verweisen im übrigen auf die folgenden Arbeiten — lassen erkennen, daß man in pathologischen Fällen erhebliche Ausschläge finden kann, die gänzlich außerhalb aller Fehler der Methode liegen.

Die wenigen Versuche an Mensch und Tier, die hier aufgeführt sind, sollen nur zur Illustration der Brauchbarkeit des hier beschriebenen Verfahrens dienen. Es ist wohl zu erwarten, daß das Verfahren sich besonders für die Untersuchung des arteriellen Blutes im Tierexperiment brauchbar zeigen wird, da es hier eine willkommene Ergänzung der schwer anwendbaren Methode der Alveolarluftbestimmung bildet.

Aber auch für Versuche am Menschen dürfte es geeignet sein, allerdings nur unter ganz bestimmten Bedingungen, wenn man sich darauf beschränken muß, Armvenenblut zu untersuchen.

Interessant wäre es auch, mit diesem Verfahren festzustellen, ob der von Haldane ermittelten individuellen Ungleichmäßigkeit in der Zusammensetzung der Alveolarluft insofern eine größere Bedeutung zukommt, als auch das Kohlensäurebindungsvermögen des Blutes einzelner Individuen konstante, merkbare Unterschiede zeigt. Da die nach Haldane bestimmte Kohlensäurespannung in den Alveolen bei einzelnen Individuen dauernd 20 $\frac{0}{0}$ höher ist als bei anderen, könnte man schon erwarten,

mit der tonometrischen Methode Unterschiede der Bindungsfähigkeit im Blute zu erhalten, wenn es sich nicht nur um eine verschiedene Anspruchsfähigkeit des Atemzentrums handeln würde.

Zusammenfassung.

1. Neben der Bestimmung der aktuellen Reaktion des Blutes besitzen auch die Kohlensäuremethoden ihre Berechtigung und sind unter gewissen Bedingungen nicht nur theoretisch richtig, sondern auch für biologische Zwecke geeigneter als physikalisch-chemische Untersuchungsmethoden, da sie schon bei kleinen Verschiebungen der Reaktion große Ausschläge erkennen lassen.

2. Die ursprüngliche Waltersche Methode (einfache Kohlensäurebestimmung im venösen Blute) bietet ziemlich viel Fehlermöglichkeiten. Sie kann als Maß einer Säuerung des Organismus nur mit Vorsicht verwertet werden und gibt mehr die Richtung an, in der sich eine Reaktionsänderung bewegt, als das Maß derselben. Die Methode der Alveolarluftbestimmung scheint keine wesentlichen Fehler zu bieten, vorausgesetzt, daß eine nennenswerte Änderung in der Erregbarkeit des Atemzentrums nicht eintritt und eine Alveolarluft im engeren Sinne überhaupt vorhanden ist. Das wird für manche Fälle von Atemstörung bestritten.

3. Die hier beschriebene tonometrische Methode ermöglicht es, die Aufnahmefähigkeit des Blutes für Kohlensäure bei bekanntem Kohlensäuredruck in der Atmosphäre, ferner bei konstantem Druck und konstanter Temperatur zu bestimmen.

4. Die tonometrische Methode scheint, wenn es sich um Untersuchungen arteriellen Blutes handelt, keine nennenswerten Einwände zu bieten. Sie ist daher für den Tierversuch den bisher bekannten vorzuziehen. Am Menschen, wo nur das venöse Blut eines Gefäßgebietes zur Verfügung steht, ist die tonometrische Methode denselben Fehlern ausgesetzt wie andere Verfahren, die nicht mit arteriellem Blute arbeiten. Durch gewisse Vorsichtsmaßregeln lassen sich die hier entstehenden Fehler vermeiden oder doch einschränken.

Experimentelle Untersuchungen über die Sauerstoffversorgung bei Anämien.

Von

R. Bieling.

(Aus der Medizinischen Poliklinik in Freiburg i. B.)

(Eingegangen am 20. Februar 1914.)

Unsere Anschauungen von der Regulation der Atmung haben sich in den letzten Jahren verschoben. Sie gehen aus von der bereits von Pflüger vertretenen Ansicht, daß die Steuerung der Atmung eine Funktion der Blutgase sei. Aber es waren doch erst die Arbeiten von Zuntz und seinen Schülern sowie von Haldane und seinen Mitarbeitern, die den erwähnten Mechanismus näher erforschten. Dabei kam Haldane nach Versuchen mit verschiedenem Kohlensäure- und Sauerstoffgehalt der Inspirationsluft zu der Überzeugung, daß es allein die Kohlensäure sei, die für die Atemregulation in Betracht komme. Diese Ansicht ist für das normale Tier wohl ohne weiteres zuzugeben. Unvereinbar hiermit mußten jedoch die Untersuchungsergebnisse bei Dyspnoe infolge Sauerstoffmangels erscheinen; hier findet sich nämlich statt der zu erwartenden Vermehrung eine Verminderung der Kohlensäurespannung im Blute. Die Autoren bildeten deshalb die Hilfs-hypothese, daß Sauerstoffmangel des Blutes die Reizschwelle des Atemzentrums für Kohlensäure herabsetzt, so daß bereits bei geringerem Kohlensäuregehalt eine Reizung des Zentrums erfolgt und eine größere Menge von Kohlensäure ausgeschieden wird. Demgegenüber hatten aber bereits Pflüger, Geppert¹⁾ und Zuntz und Löwy²⁾ die Meinung geäußert, daß diese Erscheinung mit dem Auftreten anderer Säuren im Blute zu-

¹⁾ Zeitschr. f. klin. Med. 1881, 375.

²⁾ Arch. f. d. ges. Physiol. 42, 281, 1888; Centralbl. f. d. med. Wiss. 58, Nr. 45, 1894.

sammenhänge. Diese sollten bei Sauerstoffmangel durch man- gelnde Oxydation entstehen und im gleichen Sinne wie die sonst allein die Säurewirkung ausübende Kohlensäure tätig sein. Gestützt wurde diese Auffassung durch die bekannten Arbeiten Walters¹⁾, der an säurevergifteten Kaninchen eine der Vergiftung parallelgehende Atemfrequenzsteigerung be- schrieben hatte. Auch Lehmann²⁾ hatte Ähnliches durch intravenöse Einverleibung von Salzsäure erreicht, und schließlich hat dann in neuerer Zeit Winterstein³⁾ auch etwaige, durch die starke Säure ausgetriebene Kohlensäure als Reizmittel aus- geschaltet und diesen Ergebnissen gleichsinnige Erfahrungen gesammelt. Er arbeitete an apnoischen, mit carbonatfreier Ringer-Lösung durchspülten Embryonen. Eine Reizung des Atemzentrums erfolgte bei jeder Säuerung der Durchspülungs- flüssigkeit. H-Ionen sind also der wirksame Reiz, und die Art der Säuren ist ohne wesentliche Bedeutung. Auch Haldane und seine Mitarbeiter vertreten jetzt diese Anschauung, wie aus der zusammenfassenden Arbeit von Douglas⁴⁾ hervorgeht.

Wenn diese Anschauungen richtig sind, so wird der Beginn des Sauerstoffmangels sich keineswegs sofort in einer Vermehrung der Gesamtsäuremenge des Blutes und einer dadurch verursachten Dyspnoe zeigen. Vielmehr werden die beim intermediären Ab- bau entstehenden Säuren, die infolge des Sauerstoffmangels nicht weiter oxydiert werden können (Hoppe-Seyler, Min- kowski), bis zu einem gewissen Grade die schwächere Kohlen- säure austreiben und sich an ihre Stelle setzen können. Dem- nach muß die Kohlensäuremenge des Blutes heruntergehen, ohne daß zugleich die Gesamtsäuremenge im Blute vermehrt zu sein braucht und Dyspnoe eintritt. Diese Verhältnisse wurden klargelegt durch eine große Reihe von in ihren Re- sultaten wesentlich übereinstimmenden Arbeiten von Haldane und Priestley, Hill und Flack, Haldane und Poulton⁵⁾ usw. (s. unten). Dieser in der Ruhe kompensierte Zustand kann

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 7, 148, 1877.

²⁾ Lehmann, Arch. f. d. ges. Physiol. 42, 284, 1888.

³⁾ Winterstein, ebenda 138, 167, 1910.

⁴⁾ Douglas, Ergebn. d. Physiol. 14, 338, 1914.

⁵⁾ Die Arbeiten der englischen Autoren sind bei Douglas zitiert und eingehend besprochen.

jedoch schon bei leichter Arbeit und Bewegung oder auch weiterer Einwirkung oder Verstärkung des Sauerstoffmangels in den dekompensierten Zustand mit vermehrter Säuremenge im Blut, also mit Dyspnoe übergehen. (Das Wort „Dyspnoe“ gebrauche ich stets in dem Sinne objektiv erschwerter Atmung.) Experimentell können diese Vorgänge sowohl durch Einschränkung des Sauerstoffgehaltes der Inspirationsluft, als auch durch Einverleiben von körperfremden Säuren hervorgerufen werden. Eine reine Anreicherung von Kohlensäure ohne gleichzeitiges Auftreten abnormer Säuren jedoch wird im Experiment nur zu erreichen sein, wenn man entweder eine CO₂-reiche Gas-mischung atmen läßt oder bei völlig ausreichender Sauerstoffversorgung die Verbrennung von körpereigenen Substanzen, etwa durch Arbeit, anregt. Sobald aber diese Arbeit exzessiv wird, d. h. sobald die Sauerstoffversorgung zur Verbrennung nicht mehr ausreicht, muß auch hier ein Sinken der Kohlensäurespannung im Blute eintreten. In dieser Richtung ausgeführte Versuche der oben angeführten englischen Autoren sowie von Porges, Leimdörfer und Markovici¹⁾ bestätigten diese Forderungen²⁾. Es muß demnach stets eine Verminderung der Kohlensäurespannung des Blutes das erste Zeichen des beginnenden Sauerstoffmangels sein. Wir haben also in der Bestimmung der Kohlensäurespannung in der Alveolarluft oder des Kohlensäurebindungsvermögens im arteriellen Blute ein wichtiges Hilfsmittel zur Erkennung einer abnormen Säurebildung im Organismus, die ihrerseits wiederum Ausdruck von Sauerstoffmangel sein kann.

Von diesem so festgelegten Standpunkte aus ist es möglich, an die Frage heranzugehen, ob bei Anämien sich eine Störung der Sauerstoffversorgung des Körpers in dem

¹⁾ Zeitschr. f. klin. Med. 78, 1911.

²⁾ So fanden Haldane und Priestley nach leichter Arbeit den Gehalt der Alveolarluft an Kohlensäure in Prozent einer Atmosphäre ausgedrückt bei sich auf 6,05% erhöht gegenüber 5,70% normal und 6,98% gegenüber 6,39% normal. Bei übermäßiger Arbeit jedoch sinkt die Kohlensäurespannung der Alveolarluft kurze Zeit nach der Arbeit unter die Norm herab, dann, wenn der sofort nach der Arbeit vorhandene Kohlensäureüberschuß durch die Atemzentrumsreizung entfernt und durch die abnormen Säuren ausgetrieben ist. Übereinstimmende Resultate berichten Hill und Flack, Haldane und Douglas, Porges.

Auftreten von abnormen Säuren und in der Verminderung des Kohlensäurebindungsvermögens im Blute bemerkbar macht.

Die hierhergehörigen älteren Autoren untersuchten mittels Titration die Blutalkalescenz und kamen dabei zu verschiedenen Resultaten. Kraus¹⁾, der an künstlich anämisierten Tieren arbeitete, fand die Alkalescenz herabgesetzt und glaubte diese Erscheinung in Übereinstimmung mit Resultaten von Hans Meyer²⁾ auf den kontinuierlichen Zerfall von Erythrocyten zurückführen zu müssen. Daneben war eine größere Zahl von Untersuchungen über Blutalkalescenz bei menschlichen Anämien ausgeführt worden. Aber alle diese Angaben sind, wie sie mit verschiedenen Methoden gewonnen wurden, auch in ihren Resultaten häufig recht differierend. Denn während Gräber³⁾, Peiper⁴⁾, Kraus⁵⁾, W. H. Rumpf⁶⁾, Drouin⁷⁾, Löwy⁸⁾ und Strauß⁹⁾ bei der Chlorose eine normale oder nur leicht verminderte Blutalkalescenz fanden, werden auch gegenteilige Angaben gemacht [v. Jaksch¹⁰⁾, De Renzi¹¹⁾, v. Moraczewska¹²⁾, Waldvogel¹³⁾]. Ebenso hat die Mehrzahl bei perniziöser Anämie und Leukämie die Blutalkalescenz vermindert gefunden [v. Jaksch, Peiper, Kraus, Rumpf, v. Limbeck¹⁴⁾, Strauß, v. Moraczewska, Brandenburg¹⁵⁾], während umgekehrt von Strauß und Löwy eine Erhöhung mitgeteilt wird.

Entschieden überholt werden diese älteren Arbeiten durch Beobachtungen mit den neueren Methoden, wie sie von Haldane und Priestley sowie Plesch angegeben wurden. Diese gehen davon aus, daß eine durch Sauerstoffmangel entstehende Säuerung des Blutes mit Kohlensäureschwund einhergehen muß. Indem sie also die Kohlensäurespannung der Alveolarluft bestimmen, die der des Blutes parallel geht, finden sie hierin einen Indicator und ein Maß für das Vorhandensein und die Menge der uns allein interessierenden abnormen Abbauprodukte im Blut.

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 26, 186, 1890.

²⁾ Ebenda 17, 304.

³⁾ Klinische Diagnostik der Blutkrankheiten. Leipzig 1888.

⁴⁾ Virchows Archiv 116, 337, 1889.

⁵⁾ Alkalescenz des Blutes bei Krankheiten. Prager Zeitschr. f. Heilkunde 10, 106, 1890.

⁶⁾ Centralbl. f. inn. Med. 1891, 141.

⁷⁾ Hémokalimétrie. Paris 1892. S. 83.

⁸⁾ Centralbl. d. med. Wiss. 1894, Nr. 45.

⁹⁾ Zeitschr. f. klin. Med. 30, Heft 3/4.

¹⁰⁾ Ebenda 13, 350, 1888.

¹¹⁾ Virchows Archiv 102, 218, 1885.

¹²⁾ Ebenda 144, 1896.

¹³⁾ Deutsche med. Wochenschr. 1900, Nr. 43.

¹⁴⁾ Zeitschr. f. klin. Med. 34, Heft 5/6, 1898.

¹⁵⁾ Ebenda 35, 367, 1899.

Diese Untersuchungen kommen hier besonders in Betracht, nicht nur weil sie die oben ausgeführten physiologischen Grundlagen schufen, sondern auch wegen der Angaben über die normalen Werte der Kohlensäurespannung in der Alveolarluft, die doch zum mindesten ein relatives Maß der Kohlensäurespannung im Blute sind. Außerdem aber sind auch Bestimmungen an Menschen und Tieren mit sicherem Sauerstoffmangel ausgeführt und die dabei gefundenen Veränderungen zahlenmäßig festgelegt worden. Mit der von Haldane und Priestley¹⁾ angegebenen Methode fanden die beiden Autoren bei sich selbst am Ende der Expiration Werte von 5,70 bis 6,39% für die CO₂ der Alveolarluft, Morawitz und Siebeck²⁾ von 5,1 bis 5,96% einer Atmosphäre. Die Zahlen, die Porges, der mit der Pleschschens Methode arbeitete, angibt, sind nach der Ansicht der Autoren deshalb etwas höher als die Haldaneschen, weil nach dieser Methode ein Ausgleich zwischen der Kohlensäurespannung im venösen Blut und in der Alveolarluft erzielt werden soll. Sie schwanken zwischen 5 $\frac{1}{2}$ und 7%.

Alle Untersucher betonen die merkwürdige und unerklärliche Tatsache, daß zwar die bei verschiedenen Personen gefundenen Werte in ziemlich weiten Grenzen schwanken, daß jedoch bei ein und derselben Person der Individualwert streng festgehalten wird. Ja, Miß Fitzgerald³⁾ fand sogar an den beiden Personen H. und P. bei einer Untersuchung nach 2 Jahren noch dieselben Werte vor. Auch der individuelle Unterschied war noch in derselben zahlenmäßigen Größe bestehen geblieben. Man hat vergeblich versucht, diese merkwürdige Tatsache zu erklären. Fitzgerald führt eine große Reihe von Untersuchungen an, die fast den Anschein erwecken, als ob bei Kindern die Kohlensäurespannung des Blutes geringer sei als bei Erwachsenen und in beiden Kategorien wiederum bei dem weiblichen Geschlecht geringer als bei dem männlichen. Da aber die maximalen und minimalen Werte in den 4 Tabellen kaum differieren, so ist es sehr wahrscheinlich, daß bei einer größeren Anzahl von Versuchen die Unterschiede, wenn vielleicht auch nicht verschwinden, so doch noch geringer werden. Außerdem erklärt dies gar nicht die individuellen Unterschiede bei erwachsenen Personen gleichen Alters und gleichen Geschlechts. Auch die von Fitzgerald und Porges beschriebene Tagesschwankung, die durch die Verdauung, d. h. die Salzsäureproduktion des Magens, hervorgerufen sein soll, kann hier nicht klärend wirken. Denn diese Unterschiede müßten bei einer größeren Reihe von Versuchen an denselben Personen, wie sie von Morawitz und Siebeck ausgeführt wurden, schließlich bei Berechnung des Durchschnittswertes auffallen. Es war demnach bei neuen Versuchen die Tatsache der individuell verschiedenen Werte als gegeben hinzunehmen und höchstens durch möglichst gleichmäßige Kost der Versuchsobjekte die

¹⁾ Journ. of Physiol. 32.

²⁾ Deutsch. Arch. f. klin. Med. 97, 212, 1909.

³⁾ Journ. of Physiol. 37.

Tagesschwankung als störender Faktor auszuschließen, was in den späteren Versuchen auch geschah.

Von den Tatsachen, die bei Sauerstoffmangel gefunden wurden, ist eine der wichtigsten die Erfahrung, die Haldane bereits in seiner ersten Veröffentlichung mit Priestley betont, daß nämlich eine Verminderung der Kohlensäurespannung der Alveolarluft erst eintritt, wenn die Inspirationsluft weniger als 13% Sauerstoff enthält und gleichzeitig die Sauerstoffspannung in der Alveolarluft unter 8% sinkt. Auch hierbei zeigten sich individuelle Verschiedenheiten, indem für eine andere Person der Grenzwert nicht 13, sondern 15% betrug. Versucht man auszurechnen, welcher Atmosphärendruck dieselben Bedingungen schafft wie Luft mit 13% Sauerstoff bei normalem Druck, so wird man auf 472 mm Hg oder etwa 4000 m Meereshöhe kommen. Dementsprechend fand auch Ward¹⁾ bei Bestimmung der Kohlensäurespannung in Zermatt (627 mm Hg) und auf dem Monte Rosa (444 mm Hg) die Kohlensäurespannung des Blutes in der Höhe auf 31,9 mm Quecksilber herabgesetzt gegenüber 34,9 und 35,6 im Tal. Da nun normalerweise das Hämoglobin des Blutes in der Lunge maximal mit Sauerstoff abgesättigt wird²⁾, so war es nach diesen Versuchen naheliegend, anzunehmen, daß bereits eine Herabsetzung der Erythrocytenzahl auf die Hälfte, Sauerstoffmangel in der Ruhe verursachen könnte, d. h. daß bereits bei Anämien mit 40 bis 50% Hämoglobin Sauerstoffmangel und deshalb Verminderung des Kohlensäurebindungsvermögens im Blute eintritt. Aber die Verhältnisse liegen nicht so einfach, sondern dem Organismus stehen außerdem noch eine Reihe von Kompensationsvorrichtungen zur Verfügung. Das beweisen schon die Versuche von Kraus³⁾, der auch bei ziemlich schweren Fällen von menschlicher Anämie keine Änderung des Gaswechsels fand, ja sogar noch eine Steigerungsfähigkeit desselben konstatieren konnte. Später hatten dann Morawitz und Röhmer⁴⁾ ebenso wie Douglas⁵⁾ zwar festgestellt, daß die Färbekraft und das maximale Sauer-

¹⁾ Journ. of Physiol. 37.

²⁾ Bohr, Nagels Handb. d. Physiol. d. Menschen 1, 83/84.

³⁾ Bibl. med. D 1, 1897, Heft 3.

⁴⁾ Arch. f. klin. Med. 94, 529.

⁵⁾ Journ. of Physiol. 39.

stoffbindungsvermögen des Blutes auch in pathologischen Fällen, insbesondere bei Anämien, parallel gehen. Aber zugleich machten Morawitz und Röhmer noch auf zwei wichtige Kompensationsvorrichtungen des Körpers aufmerksam; es war den Autoren, die das Blut der untersuchten Kranken mit Chlorose, perniziöser Anämie, posthämorrhagischer Anämie und Anämie bei schweren Krankheiten aus der Armvene entnahmen, aufgefallen, daß die Sauerstoffabsättigung dieses Blutes bedeutend geringer war als beim normalen Menschen. (Normalerweise 60 bis 75⁰/₀, bei schweren Anämien oft 15 bis 50⁰/₀.) Daraus konnte geschlossen werden, daß bei Anämien zuweilen eine gesteigerte prozentische Ausnützung des Sauerstoffs in den Capillaren stattfindet. Daneben sollte aber auch eine Strombeschleunigung des Blutes als eine, die erste an Bedeutung noch übertreffende Kompensationswirkung in gleicher Richtung wirken. Gestützt wurden diese Behauptungen noch durch die Tatsache, daß auch der Kohlensäuregehalt des Blutes bei den Anämien nicht unter die Norm sank, auch nicht bei einem Fall mit 20⁰/₀ Hglb. Da aber die Schlüsse aus dem Kohlensäuregehalt des Blutes, und noch dazu des venösen Blutes, nicht als ganz sicher angesehen werden konnten, so mußte von dieser Seite her die Beweiskette noch geschlossen werden. Nach den vorhergehenden Erörterungen über das Kohlensäurebindungsvermögen des Blutes als Indicator des Sauerstoffmangels war es daher von Interesse, diesen Wert für das arterielle Blut von anämischen Tieren zu bestimmen. Dies war die Aufgabe der folgenden Versuche.

Zunächst führte ich eine größere Reihe von Versuchen an normalen Kaninchen aus.

Zur Messung des Kohlensäurebindungsvermögens des Blutes verwendete ich die neue Methode von Morawitz, deren Ausführung und theoretische Begründung in der vorhergehenden Mitteilung gegeben ist¹⁾. Dabei war es möglich, die Kohlensäurespannung im arteriellen Blute direkt zu bestimmen, wodurch die Exaktheit der Ergebnisse selbstverständlich gesteigert wird. Die Tiere erhielten (mit Ausnahme des 2. Hungerversuches) 1 g Urethan pro Kilogramm Tier subcutan und darauf wurde ihnen das nötige Blut nach Einbinden einer Kanüle in die Carotis entnommen. Mit 3 ccm des auf Natr. oxalat aufgefangenen Blutes wurde die Bestimmung nach Vorschrift aufgeführt. (Siehe Tabelle I.)

¹⁾ s. Morawitz und Walker, diese Zeitschr., dieses Heft.

Tabelle I.
Versuche mit normalem Blut.

Tier Nr.	Datum	Hglb. in % nach Sahli	CO ₂ in % im arteriellen Blut (Schütteln in Luft mit 3,6% CO ₂) Einzelbestimmungen	Durchschnitt	Bemerkungen
1	15. III.	84	30,125 30,890 32,165 35,156	32,134	Minimum
	16. IV.	84	31,063 32,976		
2	26. III.	72	38,825 37,531	38,178	
	13. IV.	85	39,204 42,031	40,618	
3	24. IV.	85	34,525	34,525	
	20. V.	75	33,156 32,510 33,673	33,113	
9	21. V.	68	43,542 39,891 40,237 38,503	40,552	vgl. Tab. III 25. IV.
12	30. V.	75	38,375 37,215	37,795	
13	31. V.	75	36,807 35,974	36,391	
14	1. VI.	70	43,118 42,434	42,776	Maximum
11	31. V.	.	34,211 34,715	34,463	
Durchschnitt sämtl. Zahlen (Normalwert):				36,597	

Die hier gewonnenen Resultate zeigen zuerst wieder die merkwürdige Tatsache, daß bei verschiedenen Tieren ganz verschiedene Werte als normale anzusehen sind. So hat z. B. Nr. 1 bei 2 Versuchen, die durch eine Zeit von 4 Wochen getrennt sind, denselben Wert ergeben, der niedriger ist als der aller übrigen. Ebenso hielt Nr. 2 seinen hohen Wert mit derselben Konstanz fest. Daß es sich aber bei den Tieren mit niedrigem

Kohlensäurebindungsvermögen nicht etwa um kranke Individuen handelt, geht schon aus der Tatsache hervor, daß sie sich der mehrmaligen Blutentnahme und Narkose gegenüber ganz gleich verhalten haben, ja daß gerade das oben erwähnte Kaninchen Nr. 1 drei Blutentnahmen überlebte. Der Hglb.-Gehalt war stets ein normaler oder ließ nur auf eine leichte Stellanämie schließen, ohne daß ein deutlicher Zusammenhang zwischen seiner Höhe und der Größe des Kohlensäurebindungsvermögens zu konstatieren gewesen wäre. Hielten die Tiere doch selbst bei schwankendem Hglb.-Gehalt des Blutes denselben Alkaleszenzwert fest (Nr. 2 und 3). Die von allen neueren Untersuchern gefundenen individuellen Schwankungen lassen sich also auch beim Kaninchen ebenso wie beim Menschen, und zwar mit der Morawitzschen Methode, im arteriellen Blute feststellen.

Tabelle II.
Versuche mit zentrifugiertem Blut.

Tier Nr.	Datum	Hglb. in % nach Sahli	CO ₂ in % im arteriellen Blut (Schütteln in Luft mit 3,6% CO ₂) Einzelbestimmungen	Durchschnitt
1	16. IV.	18	30,587 36,644	33,616
2	26. III.	15	38,053 37,116 37,360	37,758
	13. IV.	22	38,503 38,089 44,318	41,204
3	24. IV.	15	31,203 33,135 32,828 34,873	33,010
Durchschnitt sämtlicher Zahlen				36,397
Normalwert				36,597

Nach Bestimmung der normalen Werte mit der tonometrischen Methode schien es mir notwendig, zu untersuchen, wieweit man noch dieselben Werte erhält, wenn man künstlich durch Zentrifugieren von Normalblut sich eine Blutmischung

herstellt, deren Gehalt an roten Blutzellen etwa dem der anämischen Tiere entspricht. Denn da das Kohlensäurebindungsvermögen von Plasma und Blutzellen nicht genau das gleiche ist, war es möglich, daß sich bei Anämien andere Werte für das CO_2 -Bindungsvermögen des Blutes finden könnten als normal, ganz unabhängig von irgendwelchen Reaktionsänderungen, einfach durch Verminderung der Blutzellen in der Volumeneinheit Blut beim anämischen Tier.

Nun sind allerdings bei einer CO_2 -Spannung von etwa 30 mm die CO_2 -Mengen, die von einem gleichen Volumen Plasma und Blutzellen gebunden werden, kaum verschieden. Ich verweise auf die Berechnung, die A. Loewy¹⁾ von diesen Dingen gibt. Immerhin schien es mir wichtig, zu untersuchen, ob etwa bereits eine Verschiebung des Verhältnisses Plasma:Blutzellen die Kohlensäurebindung wesentlich ändern kann, ganz unabhängig von einem anämischen Zustande.

Zu diesem Zwecke habe ich die Versuche der Tabelle II ausgeführt. Den Tieren 1 bis 3 wurde Blut entnommen und dieses so lange zentrifugiert, bis der Hämoglobingehalt der oberen Schichten nur noch 15 bis 22% nach Sahli betrug. Diese Blutproben wurden dann in der in der vorhergehenden Mitteilung beschriebenen Art analysiert. Die hier gefundenen Werte unterscheiden sich nicht nennenswert von normalen. Es stimmen auch nicht nur die Einzelwerte des zentrifugierten Blutes mit den normalen überein, sondern vor allem deckt sich auch die Durchschnittszahl für das zentrifugierte Blut von 36,597 genau mit der für das normale Blut von 36,597. Damit ist der Einwand entkräftet, daß anämisches Blut wesentlich höhere Werte bei unserer Bestimmung ergeben könnte, deshalb, weil nicht nur die Zahl der sauerstoff-, sondern auch der kohlen-säurebindenden Elemente verändert sei. Denn es kommt auf die Menge der Erythrocyten nicht wesentlich an. Schließlich möchte ich auch bemerken, daß alle Tiere vor der Entnahme narkotisiert wurden und sich dabei völlig ruhig verhielten, also ein störender Einfluß von Muskelarbeit ausgeschaltet war.

Jetzt erst, nach Bestimmung der Grundwerte, konnte zur Untersuchung von anämischen Tieren übergegangen werden.

¹⁾ A. Loewy, Die Gase des Körpers. Oppenheimers Handb. d. Biochem. 4, 1, S. 65.

In den nun folgenden Versuchen wurde zur Erzeugung der Anämie salzsaures Phenylhydrazin verwendet. Die Tiere erhielten allmählich steigende Dosen einer 1%igen Lösung subcutan, mit $\frac{1}{2}$ ccm beginnend, innerhalb 8 bis 10 Tagen auf 3 ccm täglich steigend, in welcher Zeit ihr Hämoglobingehalt dann auf Werte von 25 bis 29% nach Sahli gefallen war. Sollte er nunmehr noch weiter herabgesetzt werden, so mußten Dosen bis zu 5 ccm verwendet werden, womit dann wiederum innerhalb 5 bis 7 Tagen Werte von 15 bis 20% erreicht wurden. Bei der fortschreitenden Verschlechterung des Blutes zeigte dieses die bekannten, von Tallqvist¹⁾ beschriebenen Veränderungen. Die Tiere waren in dem Zustande der Anämie sehr schwach und matt, magerten auch ganz entschieden ab. In der Ruhe zeigten die Tiere mit 25 bis 29% Hämoglobin keine Veränderung der Atemfrequenz. Bei den Tieren mit 15 bis 20% wurde manchmal eine leichte Frequenzsteigerung der Atmung gesehen, allerdings nicht regelmäßig. Da die Blutentnahme wiederum in Urethan-Narkose geschah und die Tiere dabei keinerlei Abwehrbewegungen ausführten, so kann auch hier ein störender Einfluß der Muskelarbeit ausgeschlossen werden. Ebenso war die Ernährung der Tiere möglichst gleichmäßig (siehe Tabelle III und IV).

Wenn wir die Resultate der Tabelle III zuerst betrachten, so sehen wir, daß sowohl die Einzelwerte, wie vor allem die Durchschnittszahl von 36,983 innerhalb der Fehlergrenzen genau den Normalwerten der Tabelle I und II entspricht. Wichtig ist hier auch das Ergebnis bei Nr. 9; denn bei diesem Tiere wurde 4 Wochen nach der ersten Bestimmung eine zweite gemacht, nachdem es bereits wieder 68% Hglb. hatte, und nur eine unwesentliche Erhöhung des Kohlensäurebindungsvermögens gefunden. Demnach kommen wir zu der Ansicht, daß bei anämischen Tieren mit 25 bis 29% Hglb. im Ruhezustand keine Regulationsstörung eingetreten ist, in dem Sinne, daß abnorme Säuren infolge Sauerstoffmangels an Stelle der Kohlensäure getreten sind.

Anders dagegen liegen die Verhältnisse bei den in Tabelle IV aufgeführten Resultaten bei schweren Formen von Anämie mit

¹⁾ Tallqvist, Über experimentelle Blutgiftanämien. Helsingfors 1900.

weniger als 20% Hglb. Zwar hält auch hier Tier Nr. 4 mit 19% Hglb. den normalen Durchschnittswert von 36% Kohlensäure fest, aber das Kohlensäurebindungsvermögen der übrigen geht stets, und zwar teilweise auch ganz beträchtlich unter den Normalwert herunter. Sehr schön wird das durch das Ergebnis bei Nr. 7 illustriert. Dieses Tier, das 4 Wochen vorher mit 28% Hglb. ein Kohlensäurebindungsvermögen von 37,752 gezeigt hatte, ergibt mit 15% nur noch den Wert 34,406, also einen Unterschied von mehr als 3%. Dem entspricht dann auch die Tatsache, daß der Durchschnittswert der schweren Anämien mit 32,742 um $3\frac{1}{2}$ bis 4% unter dem Normalwert zurückbleibt. Zwischen den Tieren unter 20 und denen über 25% Hglb., bestand außerdem, worauf ich schon oben aufmerksam machte, der Unterschied, daß bei den ersteren häufig Dyspnoe, d. h. vermehrte Atemfrequenz, gesehen wurde.

Tabelle III.

Anämische Tiere mit 25 bis 29% Hglb.

Tier Nr.	Datum	Hglb. in % nach Sahli	CO ₂ in % im arteriellen Blut (Schütteln in Luft mit 3,6% CO ₂) Einzelbestimmungen	Durchschnitt
4	11. III.	29	32,766 35,782 36,463 34,733	34,936
5	12. III.	29	33,895 38,316 34,128 38,220	36,140
7	29. III.	28	39,260 39,501 34,874 37,373	37,752
9	25. IV.	25	37,378 38,002 40,953 40,087	39,130
Durchschnitt sämtlicher Zahlen . .				36,983
Normalwert				36,597

Tabelle IV.
Anämische Tiere mit 15 bis 20% Hglb.

Tier Nr.	Datum	Hglb. in % nach Sahli	CO ₂ in % im arteriellen Blut (Schütteln in Luft mit 3,6% CO ₂) Einzelbestimmungen	Durchschnitt
4	20. III.	19	37,496 35,837 34,493 36,648	36,119
6	22. III.	20	30,698 33,299 28,751 32,257	31,251
7	26. IV.	15	33,061 35,443 33,523 35,597	34,406
8	24. IV.	15	30,144 30,203 27,264 29,151	29,163
Durchschnitt sämtlicher Zahlen . .				32,742
Normalwert				36,597
Unterschied				3,855

Wenn ich oben in den Tabellen 20% Hglb. als den Grenzwert aufstellte, so ist nunmehr darauf hinzuweisen, daß hierin eine gewisse Willkür liegt; denn wie ja schon allein das Verhalten von Nr. 4 beweist, kann der Hämoglobinwert des Blutes, bis zu dem eine Veränderung des Kohlensäurebindungsvermögens in der Ruhe nicht eintritt, bei verschiedenen Tieren wieder verschieden hoch sein. Dem entspricht die von Haldane und Priestley gefundene Tatsache, daß auch beim Menschen im allgemeinen eine Einschränkung des Sauerstoffgehaltes der eingeatmeten Luft unter 13% erst mit einer Verminderung der Kohlensäurespannung der Alveolarluft beantwortet wird, daß jedoch bei anderen Individuen die kritische Zahl bereits 15% ist. Trotz dieses, also auch bei dem Kaninchen offenbar vorhandenen individuellen Faktors glaube ich doch, daß im allgemeinen die Grenze, bis zu der die Sauerstoffträger

vermindert werden können, ohne daß eine Störung der Sauerstoffversorgung des Körpers in der Ruhe eintritt und also das Blut mit abnormen intermediär gebildeten Säuren überladen wird, etwa erst bei 20% Hglb. liegt. Dies beweist vor allem die Durchschnittszahl.

Ein bedeutender Unterschied besteht also darin, wie wir nun sehen, ob man den Sauerstoff der eingeatmeten Luft einschränkt, oder ob man die Sauerstofftransporteure vermindert. Denn wie aus den mehrfach zitierten Angaben Haldanes hervorgeht, erhält man bereits bei einer Beschränkung der Sauerstoffzufuhr in einem Grade, daß der alveolare Sauerstoff auf 8%, d. h. also auf die Hälfte des Normalen fällt, einen Ausschlag. Will man dagegen den gleichen Effekt durch Anämisieren erhalten, so muß man die Zahl der roten Blutkörperchen auf etwa $\frac{1}{4}$ bis auf $\frac{1}{6}$ des Normalen herabsetzen. Und dieses ist verständlich, denn trotz Herabsetzung des Hglb.-Gehaltes des Blutes wird es dem Organismus mit normalen Kreislaufsorganen möglich sein, z. B. durch Vermehrung der in der Zeiteinheit durch die Lunge getriebenen Blutmassen, eine gleichgroße Menge von Sauerstoffträgern passieren zu lassen. Daneben kommt noch die vermehrte Ausnützung des Sauerstoffs im Blute Anämischer in Betracht. Eine Vermehrung der Atemfrequenz tritt, wie die Beobachtungen an den Tieren mit 25 bis 29% zeigen, nicht ein. Sie kann es auch nicht nach unseren Ergebnissen, da ja eine Vermehrung der Blutsäure, d. h. der das Atemzentrum reizenden Substanzen, nicht stattfindet. Man sieht Ruhedyspnoe also erst bei den Tieren der Tabelle IV.

Tabelle V.
Hungertiere.

Tier Nr.	Hungerzeit Stunden	CO ₂ in % im arteriellen Blut (Schütteln in Luft mit 3,6% CO ₂) Einzelbestimmungen	Durchschnitt	Bemerkungen
10	48	32,704 33,175 32,704 33,874	33,114	
11	46 $\frac{1}{2}$	31,514 31,250	31,382	Normalversuch 34,463
Durchschnitt sämtlicher Zahlen			32,248	
Normalwert			36,597	

Nun war es aber aufgefallen, daß die Tiere mit fortschreitender Verschlechterung ihres Blutes nicht nur ruhiger, träger und schwächer wurden, sondern auch in ihrer Freiluft nachließen. Es war daher zu erwägen, ob nicht eine Hungeracidose bei der Beurteilung der Ver-

suche in Betracht käme. Die bereits früher von Geppert¹⁾ und Drouin²⁾ ausgeführten Alkaleszenzbestimmungen des Blutes im Hungerzustande haben keine oder doch nur eine ganz unbedeutende Herabsetzung ergeben. Andererseits aber hatte v. Noorden³⁾ für den Hungerzustand eine starke Produktion saurer Verbindungen (Phosphorsäure, Schwefelsäure, Acetessigsäure, β -Oxybuttersäure) behauptet, und Mohr⁴⁾ sowie Satta⁵⁾ haben sogar beobachtet, daß diese Säureproduktion der Dauer und Intensität der Nahrungsentziehung parallel gehen. Dem entspricht auch die von Brugsch⁶⁾ gefundene Vermehrung des Harnammoniaks, eine Angabe, die allerdings in teilweisem Widerspruch zu früheren Mitteilungen von Freund⁷⁾ steht. Horodynski⁸⁾ hat auch den Blutammoniakgehalt im Hungerzustand vermehrt gefunden. Auch diese letztere Mitteilung widerspricht den Angaben von Nenoki, Pawlow und Zaleski⁹⁾. Da also diese Verhältnisse noch nicht ganz geklärt zu sein schienen, andererseits aber als Fehlermöglichkeit bei der Deutung der Versuche in Betracht kamen, so machte ich mit der neuen Methode auch 2 Bestimmungen an Hungertieren. Es wurde zu diesem Zwecke ein normales Tier 48 Stunden ganz ohne Nahrungszufuhr, mit alleiniger Möglichkeit der Wasseraufnahme gehalten und bei ihm im Durchschnitt ein Kohlensäurebindungsvermögen von 33,114% festgestellt. Dieser Wert bleibt zwar unter der Normalzahl erheblich zurück, doch liegt er noch innerhalb der physiologischen Schwankung. Daher wurde einem zweiten normalen Tiere $4\frac{1}{2}$ ccm Blut, dieses Mal ohne Narkose, entnommen, und der Wert 34,463 festgestellt. Nach 5 Tagen Erholung hungerte dieses Tier bei Wasser $46\frac{1}{2}$ Stunden, und die nunmehr wiederum ohne Narkose entnommene Blutprobe ergab einen Wert von 31,382%, also eine Verminderung um 3,081%. Außerdem ist der Wert kleiner als der geringste der Normaltabelle. Hiernach ließ sich also übereinstimmend mit den Angaben der oben aufgeführten Autoren eine vermehrte Säureproduktion des Körpers im Hungerzustande feststellen. Aber dieses erklärt doch nicht den Unterschied der Werte von Tieren über und unter 20% Hgbl., da ja auch die ersteren bereits eine geringere Nahrungsaufnahme als normal zeigten, ohne daß die bei ihnen gefundenen Werte für das Kohlensäurebindungsvermögen unter die Norm herabsanken. Andererseits aber fraß auch das anämische Tier Nr. 8 noch bis zum Schluß. Es handelte sich also niemals um einen totalen Hungerzustand, sondern höchstens um eine Unterernährung, die auch

1) Zeitschr. f. klin. Med. 2, 364, 1880.

2) l. c.

3) Lehrb. d. Pathol. d. Stoffw. S. 176.

4) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 1, 1904.

5) v. Noorden, Sammlung klin. Abhandlungen 1903, Heft 3/4.

6) Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 1, 419, 1905.

7) Virchows Jahrb. 37, 162, 1902.

8) Wiener klin. Rundschau 1901, Nr. 5/6.

9) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 37, 26, 1896.

stets nur wenige Tage dauerte. Es ist daher nicht wahrscheinlich, daß eine Hungeracidose in Betracht kommt, da das Herabgehen der Kohlensäurebindung des Blutes sich besonders bei den stark anämischen Tieren fand.

Unmöglich ist es auch, die Verminderung des Kohlensäurebindungsvermögens unter Ausschaltung des Faktors des Sauerstoffmangels als eine einfache Funktion des Blutzellenzerfalles anzusehen, wie dies seinerzeit Meyer und Kraus wollten. Denn der Blutkörperchenzerfall dürfte doch bei den schwächeren Anämien ungefähr so groß sein als bei den stärkeren. Die Tatsache, daß nämlich bei fortschreitender Anämie größere Dosen von Phenylhydrazin gegeben werden mußten, ist nicht durch eine gesteigerte Produktion, sondern durch eine vermehrte Resistenz der Erythrocyten gegen das Gift zu erklären. Und wenn auch selbst die Möglichkeit des Entstehens von abnormen Säuren bei der Anämie wohl zugegeben werden kann, so ist es doch unverständlich, weshalb diese nicht verbrannt werden sollten, wenn nicht gleichzeitig Sauerstoffmangel besteht.

Demnach bleibt die Ansicht bestehen, daß bei schweren Anämien, infolge Sauerstoffmangels abnorme intermediäre Säuren im Körper kreisen, die das Atemzentrum reizen und das Kohlensäurebindungsvermögen des arteriellen Blutes herabsetzen. Dagegen ist es auffallend und von Wichtigkeit, daß diese Regulationsstörung, soweit der Ruhezustand in Frage kommt, erst bei sehr schweren Anämien mit so geringem Hämoglobingehalt auftritt, wie sie am Krankenbett selten zur Beobachtung kommen, und daß sie auch hier keineswegs bedeutend ist. Wir kommen also zu der Ansicht, daß bei den leichteren Anämien ein Sauerstoffmangel im Ruhezustand in der Regel nicht besteht, wahrscheinlich deshalb, weil die Herzaktion kompensierend eingreift. Der Begriff des Sauerstoffmangels bei menschlichen Anämien ist also demnach vorsichtig zu gebrauchen. Das freilich wird man annehmen dürfen, daß auch die Tiere mit 25 bis 29% Hglb. auf geringe Arbeit nicht mit einer Erhöhung der Kohlensäure im Blute reagieren, wie dies normalerweise geschieht, sondern daß vielmehr hier mäßige Arbeit bereits Sauerstoffmangel verursacht und also denselben Effekt wie bei normalen Tieren exzessive Arbeit hervorbringt. Die regulatorische Reservekraft wird also auch bei diesen Anämien vermindert sein.

Meine experimentellen Beobachtungen stehen in guter Übereinstimmung mit denen von Fitzgerald¹⁾, die sich auf

¹⁾ Fitzgerald, Journ. of Pathol. u. Bact. 4, 1910.

menschliche Anämie beziehen und mit einer ganz anderen Methode, nämlich der Haldaneschen Methode der Alveolarluftbestimmung gewonnen wurden. Fitzgerald fand selbst bei ziemlich schweren Anämien kein Herabgehen der alveolaren Kohlensäurespannung.

Zusammenfassung.

1. Bei der Bestimmung des Kohlensäurebindungsvermögens im arteriellen Blut von Kaninchen nach Morawitz findet man bei verschiedenen Bestimmungen an demselben Tiere konstante Werte, bei verschiedenen Tieren jedoch ergeben sich größere, ebenfalls konstante Unterschiede.

2. Zweitägiger totaler Hunger setzt das Kohlensäurebindungsvermögen herab, wohl infolge Hungeracidose.

3. Das arterielle Blut anämischer Tiere mit 25 bis 29% Hglb. hat in der Ruhe normales Kohlensäurebindungsvermögen. Es besteht bei diesen Anämien sicher in der Ruhe kein Sauerstoffmangel.

4. Stark anämische Tiere dagegen, mit weniger als 20% Hglb., zeigen geringen Sauerstoffmangel auch im Ruhezustand. Das kommt in einem herabgesetzten Kohlensäurebindungsvermögen des arteriellen Blutes zum Ausdruck.

Über verminderte Blutalkalescenz bei experimenteller Urämie.

Von

Fritz Elmendorf.

(Aus der Medizinischen Poliklinik in Freiburg i. B.)

(Eingegangen am 20. Februar 1914.)

Das klinisch so bunte Erscheinungsbild des Symptomenkomplexes, den wir als Urämie zu bezeichnen pflegen, hat schon seit langem die Forschung dazu angeregt, für die verschiedenartigen Erscheinungsformen eine einheitliche ätiologische Grundlage zu finden. Im Anschluß an die genauere Kenntnis des „Morbus Brightii“ wurden zunächst der Reihe nach die verschiedensten Harnschlacken und Salze in ihrer Giftwirkung erforscht; doch gelangte man weder bei Betrachtung einzelner solcher Schlacken, noch durch die Zusammenfassung ihrer Gesamtsumme zu einer bestimmten Grundlage bezüglich ihres Mitwirkens beim Zustandekommen einer Urämie. Bald suchte man nun das Bild einer Vergiftung von anderer Seite zu erforschen; denn daß es sich bei der Urämie um eine Vergiftung des Körpers handelt, ist seit der Widerlegung von Traubes Theorie des „Hirnödems“ (Senator)¹⁾ der Grundgedanke fast aller späterer Forscher gewesen.

v. Jaksch²⁾ teilte 1888 als erster Befunde über herabgesetzte Alkalescenz des Blutes bei Urämie mit. Ähnliche Resultate haben bald nach ihm Rumpf³⁾, Brandenburg⁴⁾, v. Limbeck⁵⁾ gefunden. Letzterer jedoch gab an, daß bei nephrektomierten Hunden keine Herabsetzung, sondern eine Erhöhung der Al-

¹⁾ Senator, Die Erkrankungen der Nieren. 2. Aufl. Wien 1902.

²⁾ v. Jaksch, Zeitschr. f. klin. Med. **13**, 350, 1888.

³⁾ W. H. Rumpf, Centralbl. f. klin. Med. **1891**, 441.

⁴⁾ Brandenburg, Zeitschr. f. klin. Med. **36**, 267, 1899; **45**, 157, 1902.

⁵⁾ Limbeck, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **30**, 195, 1892.

kalescenz zu beobachten sei. Dieser Befund scheint mir im Einklang zu stehen mit den neueren Erfahrungen der Italiener¹⁾, wonach der Verbleib der Nieren im Körper für das Zustandekommen einer Urämie wesentlich ist, ein Punkt, der für unser experimentelles Vorgehen zu beachten war.

Von dieser Seite wurde dann versucht, im Anschluß an Bouchards Lehre von den Autointoxikationen neues Licht in die Ätiologie der Urämie zu bringen. Besonders auf Anregung Ascolis²⁾, eines der besten Kenner der Urämie, wurden derartige Untersuchungen ausgeführt.

In neuerer Zeit mehren sich nun aber doch wieder die Mitteilungen über eine mögliche Acidose bei der Urämie. So haben im letzten Jahre Straub und Schlayer³⁾ analog den Untersuchungen bei diabetischer Acidose mittels der Haldaneschen Methode zur Bestimmung der Kohlensäurespannung in der Alveolarluft der Lungen über eine Abnahme der CO₂-Spannung bei der Urämie berichtet und daraus auf eine Acidose geschlossen. Schon vor ihnen haben Porges, Leimdörfer und Markovici⁴⁾ mit einer von Plesch angegebenen Methode ähnliche Resultate erhalten. Diese Autoren haben vor allem auch die theoretischen Grundlagen erörtert, die uns berechtigen, bei verminderter CO₂-Spannung der Alveolarluft auf eine herabgesetzte Alkalescenz des Blutes und damit zugleich auf eine Acidose des Körpers zu schließen. Es lag aber immerhin nahe, aus Gründen, die in der Arbeit von Morawitz und Walker⁵⁾ erörtert sind, das Blut selbst auf seine Alkalescenz hin zu untersuchen. Alle diesbezüglichen Untersuchungen leiden an großer Mangelhaftigkeit der angewandten Methoden. v. Jaksch⁶⁾ und die älteren Autoren bedienten sich noch einer einfachen Titriermethode von Landois. Später suchte man durch Titration nach Fällung des Gesamteiweißes durch Ammonsulfat genauere Resultate zu erhalten. Diese und ähnliche Verfahren suchten

¹⁾ Ascoli, Vorlesungen über Urämie. Jena 1903. — G. A. Pari, Deutsche med. Wochenschr. 1912, 1425.

²⁾ Ascoli, Vorlesungen über Urämie. Jena 1903.

³⁾ Straub und Schlayer, Münchner med. Wochenschr. 1912, 569.

⁴⁾ Porges, Leimdörfer und Markovici, Zeitschr. f. klin. Med. 73, 389, 1911.

⁵⁾ Morawitz und Walker, diese Zeitschr., dieses Heft.

⁶⁾ v. Jaksch, Zeitschr. f. klin. Med. 13, 350, 1888.

nach Möglichkeit den Gesamtwert der Mineralalkalescenz zu ermitteln. Walter¹⁾ wies zuerst darauf hin, daß man in der Bestimmung der Kohlensäure als dem wesentlichen Faktor für die Blutalkalescenz einen bequemen Weg habe, um über veränderte Alkalescenzwerte Aufschlüsse zu bekommen. Die Anwendbarkeit dieser Methode bewiesen ganz besonders Minkowskis²⁾ grundlegende Arbeiten über das Coma diabeticum und das Fieber. Immer jedoch handelt es sich um Vergleichsbestimmungen, niemals um absolute Werte. Die mannigfachen Bedenken gegen alle diese Methoden finden ihren deutlichen Ausdruck in v. Noordens³⁾ Worten: „Man hat bekanntlich allen Alkalescenzbestimmungen im Blute ein gewisses Mißtrauen entgegenzusetzen, denn eine einwandfreie Methode gibt es noch nicht.“

Ich wurde nun von Herrn Professor Morawitz⁴⁾ aufgefordert, nach einer jüngst von ihm vorgeschlagenen neuen Methode zur Bestimmung der Blutalkalescenz Untersuchungen an experimentell urämisch gemachten Tieren vorzunehmen. Einerseits sollten dadurch die neuen Untersuchungen über Acidose bei Urämie eine weitere Stütze erhalten, andererseits aber auch die Brauchbarkeit der Methode neuerlich geprüft werden. Schon vorher hatte Bieling⁵⁾ in einer noch unveröffentlichten Arbeit dieselbe angewandt. Ihr Prinzip ist kurz folgendes:

Ein bestimmtes kleines, durch Aderlaß gewonnenes Volumen Blut (um Gerinnung zu verhüten, wurde eine Spur Natriumoxalat zugesetzt) wird in einem größeren Gefäß mit einer CO₂-Atmosphäre von bestimmter Konzentration und bestimmtem Volumen in Berührung gebracht bzw. längere Zeit geschüttelt (in unserem Falle 5 ccm Blut mit 250 ccm einer 3,6%igen Kohlensäureatmosphäre). Wir dürfen nun annehmen, daß bei stets gleichbleibenden Versuchsbedingungen, also besonders bei stets gleicher CO₂-Spannung im Schüttelgefäß, das Blut so viel CO₂ aufnehmen wird, als seine übrigen Säurewerte zulassen; gleichgültig dabei ist, ob und wieviel CO₂ schon von vornherein gebunden war, da diese jedenfalls geringe Menge im Vergleich zu der relativ großen „künstlichen CO₂-

¹⁾ Walter, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 7, 148, 1877.

²⁾ Minkowski, Mitteil. a. d. med. Klinik zu Königsberg 1888, 174.
— Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 19, 209, 1885.

³⁾ v. Noorden, Handb. d. Pathol. d. Stoffwechsels. 2. Aufl. 1, 1025.

⁴⁾ Morawitz, Vortrag in der Med. Gesellschaft in Freiburg i. B. Ref. Deutsche med. Wochenschr. 39, 1536, 1913; s. ferner diese Zeitschr., dieses Heft.

⁵⁾ Bieling, Über experimentelle Anämien. Diese Zeitschr., dieses Heft.

Atmosphäre“ kaum einen Fehler darstellen wird. Die ganze Prozedur soll bei Körpertemperatur (im Thermostaten oder in der von Morawitz angegebenen Thermosflasche) vorgenommen werden. Die gesamte CO₂-Menge des Blutes wird nun gasanalytisch mittels der von Barcroft¹⁾ angegebenen Methode bestimmt, wobei zu beachten ist, wie bei jeder Blutgasanalyse, daß keine weitere Berührung mit der Luft stattfindet. Das Verfahren entspricht zum Teil dem von Loewy und Münzer²⁾ angewandten. Diese Autoren stellten fest, daß des Blut experimentell säurevergifteter Tiere, frisch entnommen, nur sehr wenig CO₂ enthält, durch Schütteln in einer Kohlensäureatmosphäre jedoch noch ziemlich viel aufnehmen kann. Die Werte erreichen aber niemals dieselbe Höhe wie in der Norm. Wir ziehen den rückläufigen Schluß: Sollte sich bei unseren Versuchen im Blute eine Abnahme des Bindungsvermögens für die CO₂ herausstellen, so ist die Ursache dafür wahrscheinlich eine ähnliche wie oben, d. h. eine Säurevergiftung³⁾.

Bezüglich der Vorversuche am normalen gesunden Individuum darf ich mich in der Hauptsache auf Bielings Arbeit berufen. Kurze Versuche von mir ergaben ebenfalls die in den letzten Jahren stets bestätigte Tatsache, daß jeder Organismus bestrebt ist, den ihm eigentümlichen CO₂-Gehalt im Blute immer auf annähernd gleicher Höhe zu halten. Dagegen sind die Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen und Spezies bedeutender. Kleinere Schwankungen werden natürlich durch den Wechsel in Nahrungsaufnahme und Verdauungsarbeit oder auch durch Muskeltätigkeit hervorgerufen.

Meine Versuche ergaben:

CO₂-Gehalt des venösen Blutes:

Beim Menschen.

	Am 1.	2.	3. Tage
Versuchsperson Lo.	40,3	39,8	41,4 % CO ₂
Versuchsperson El.	44,6	—	44,0 % CO ₂

Bei Katzen.

	Am 1.	2.	3. Tage
Katze 1	29,4	28,4	29,1 % CO ₂
Katze 2	29,1	29,7	— % CO ₂
Katze 3	27,2	27,2	29,0 % CO ₂

¹⁾ Barcroft, *Ergebn. d. Physiol.* 7, 771, 1908.

²⁾ Löwy und Münzer, *Dubois' Arch. f. Physiol.* 81, 174, 1901.

³⁾ Bezüglich der Technik vgl. im übrigen die vorstehende Arbeit von Morawitz und Walker.

Bei Hunden.

	Am 1.	2.	3.	4. Tage
Hund 1 . . .	30,6	—	29,8	— % CO ₂
Hund 2 . . .	32,7	—	—	33,1 % CO ₂

Bei den Tieren wurde in den meisten Fällen arterielles, durch Aderlaß aus der Carotis gewonnenes Blut untersucht; die jeweils zweite Probe bei den Katzen und die letzte Probe bei Hund 2 sind venösen Ursprungs. Ein wesentlicher Unterschied ergab sich also nicht. Die Untersuchungen an den zwei Hunden sind deshalb noch von besonderer Bedeutung, weil ich die Hunde vom 1. Versuchstage an hungern ließ, um den Einfluß kürzerer Inanitionsperioden kennen zu lernen, damit ich bei meinen späteren Untersuchungen über die kurzdauernde experimentelle Urämie eine Inanitionsacidose ausschließen konnte. Besonders v. Noorden¹⁾ weist immer wieder darauf hin, daß die Acidose bei der Urämie auch leicht durch die meist vorhandene längere Inanition bedingt sein könnte. Nach obigen Resultaten ist dieser Fall jedenfalls für meine experimentellen Untersuchungen nicht zutreffend.

Zur experimentellen Erzeugung der Urämie hat man sich bisher entweder der Nierenexstirpation, der Unterbindung der Nierengefäße oder der Unterbindung der Ureteren bedient; die beiden ersten Methoden führten nur selten zu Erscheinungen, die man als urämische deuten konnte. Besonders die doppel-seitige Nierenexstirpation macht keine so schweren Erscheinungen wie z. B. die Ureterenunterbindung; daher sind auch die Italiener²⁾ geneigt, der erkrankten Niere selbst bei der Urämie einen spezifischen Einfluß durch Nephrolysinbildung zuzuschreiben. Auch die Ureterenunterbindung schafft ja keineswegs Verhältnisse, wie sie häufig einer klinischen Urämie zugrunde liegen. Ascoli verwirft diese Fälle prinzipiell und wünscht sie abzutrennen, bringt aber andererseits in seiner symptomatischen Darstellung doch manche Fälle von plötzlichem Ureterenverschluß.

¹⁾ v. Noorden, Handb. d. Pathol. d. Stoffwechsels. 2. Aufl. 1, 1025.

²⁾ Ascoli, Vorlesungen über Urämie. Jena 1903. — G. A. Pari, Deutsche med. Wochenschr. 1912, 1425.

Auch nach der Darstellung älterer Autoren (Feltz und Ritter¹⁾) scheint die Ureterenunterbindung am sichersten urämische Erscheinungen hervorzurufen. Ich habe daher einstweilen diesen Weg gewählt.

Die Methode ist im ganzen ziemlich einfach. Erste Blutentnahme und Unterbindung wurden in einer Sitzung gemacht. Es empfiehlt sich ein möglichst kurzer Schnitt gleich oberhalb der Symphyse. Man findet so leicht die Uretereneinmündungen in die Blase und unterbindet kurz oberhalb derselben. Die zweite Blutentnahme wurde gemacht, wenn der baldige Tod des Tieres zu erwarten stand, jedoch nicht vor dem 3. Tage. Zuerst benutzte ich Katzen als Versuchstiere; zwei Resultate ergaben:

	CO ₂ im Blute vor Unterbindung %	CO ₂ im Blute am 3. Tage darauf %
Katze 1	27,5	20,9
" 2	28,5	24,6

Da jedoch die Tiere nach der Unterbindung keine irgendwie urämischen Erscheinungen darboten, sondern lediglich vom 2. Tage ab ein schneller Verfall eintrat, und da ich weiterhin viele Tiere verlor, beschloß ich, die nächsten Versuch an Hunden vorzunehmen. Immerhin zeigt sich auch bei Katzen eine Herabsetzung des CO₂-Gehaltes des Blutes, so daß ich glaube, die Versuche anführen zu dürfen, ohne sie indes für wesentlich zu halten.

Um bei den weiteren Versuchen an Hunden nicht durch längere Krankengeschichten zu ermüden, will ich kurz das Einheitliche der Erscheinungen nach der Operation zusammenfassen:

	CO ₂ im Blute vor dem Versuch %	Urämische Erscheinung am Tag nach der Operation	CO ₂ im Blut %	Tod erfolgte
Hund 1 . .	35,1	am 3. Tag	26,3	nachts darauf
" 2 . .	28,8	" 2. "	24,1	" "
" 3 . .	27,8	" 5. "	17,8	nach 5 Std.
" 4 . .	30,4	" 3. "	19,5	" 24 "
" 5 . .	39,7	" 4. "	24,2	nachts darauf
" 6 . .	35,9	" 3. "	23,9	" "

Am Abend des Operationstages liefen die Hunde bereits wieder umher, einige hin und wieder etwas winselnd. Am 2. Tage anscheinend

¹⁾ Feltz und Ritter, De l'urémie expérimentale. Paris 1881.

des Wohlbefindens; kein Erbrechen, starker Durst. Feste Nahrungsaufnahme nur bei Hund 1, 3 und 5. In der Regel traf man die Hunde dann am 3. Tage schon mit starken, anscheinend urämischen Erscheinungen: Erbrechen, in allen Fällen sehr stark, Krämpfe, die bei Hund 1, 3 und 6 von deutlich klonischem Charakter ausbrachen, fehlten bei den übrigen Tieren, doch fanden sich bei ihnen häufige flimmernde Muskelzuckungen. Bemerkenswert war auch das plötzliche schreckhafte Auffahren der Tiere beim Anruf oder anderen plötzlichen Geräuschen. Sofort darauf aber wieder ein Versinken in den komatösapathischen Zustand. Die Atmung war bei allen Tieren oberflächlich-beschleunigt, also stark überventilierend, nur bei Hund 4 und 5 Andeutung von Cheyne-Stokeschem Typus. Ganz besonders bemerkenswert ist, daß Hund 3 erst am 5. Tage deutliche urämische Erscheinungen darbot; die ersten Tage war dem Tier überhaupt nichts anzumerken, es war munter und zutraulich wie vorher, fraß mit bestem Appetit, so daß ich anfangs fürchtete, eine Unterbindung habe sich vielleicht gelöst. Doch ergab die spätere Autopsie, die auch in den übrigen Fällen stets zur Kontrolle ausgeführt wurde, das übliche Bild: hämorrhagisch-nephritische Veränderungen beider Nieren, leichte Dilatation der Ureteren oberhalb der Unterbindungsstellen. Bisher lauteten die Angaben stets, daß die absolute Harnsperrre bei Tieren innerhalb dreier Tage zum Tode führe¹⁾. Obiger Fall zeigt, daß sich diese Frist doch noch etwas verlängern läßt; durchschnittlich war auch ich genötigt, am 3. Tage meine Enduntersuchung vorzunehmen: Hund 4 und 5 hielten bis zum 4. Tage aus.

Betrachten wir nun die Werte der CO_2 im Blute, so fällt zunächst die individuell starke Verschiedenheit beim Normalen auf, so zwar, daß sich die niedrigsten Werte der Norm beinahe mit den höchsten Werten bei der Urämie berühren, eine Erscheinung, die auch in früheren Untersuchungen mehr oder weniger zutage tritt. Unzweifelhaft ist aber das jedesmalige Absinken der Werte nach Ausbruch der Urämie; in keinem Fall finden wir ein Gleichbleiben des Wertes oder geringere Schwankungen, wie wir sie oben bei den hungernden Tieren beobachtet haben, und deren Ursachen zum Teil in wechselnder Lebensweise, zum Teil in methodischen Fehlern beruhen.

Es bestätigt also auch unsere Methode den alten Befund, daß die Blutalkalescenz bei der Urämie herabgesetzt ist; vorausgesetzt allerdings, daß die Art unseres experimentellen Vorgehens gerechtfertigt ist. Ich habe schon erwähnt, daß Ascoli starke Bedenken dagegen vorbringt; er will alle Symptome, die nach plötzlichem Ureterenverschluß auftreten und in gleicher

¹⁾ Ascoli, Vorlesungen über Urämie. Jena 1903. — G. A. Pari, Deutsche med. Wochenschr. 1912, 1425.

Weise bei der klinischen Urämie erscheinen, nur als „begleitende“ ansehen; ja, er wirft sogar die Frage auf, ob es nicht besser wäre, den klinischen Begriff der Urämie als einheitliches Ganzes fallen zu lassen und ihre einzelnen Erscheinungsformen voneinander zu trennen. Denn es gibt bisher kein Symptom, das wirklich in allen Fällen von Urämie als wesentlich zu bezeichnen wäre; die herabgesetzte Alkalescenz des Blutes wäre vielleicht ein solches. Will man jedoch die Untersuchungen bei experimenteller Urämie nicht gelten lassen, bei der diese Säuerung also ebenfalls stattfindet, so sinkt auch dieses Symptom zu einem begleitenden herab.

Kurz berichten möchte ich noch über Versuche, bei denen ich auf anderem Wege eine Urämie zu erzeugen suchte. Die neueren experimentellen Nephritis-Forschungen boten vielleicht eine Möglichkeit. Am geeignetsten erschien mir das Vorgehen Richters¹⁾, der als erster durch Vergiftung mit Urannitrat eine tödliche Nephritis erzeugte, die mehr als das bisher bei den älteren Versuchen mit Sublimat, Cantharidin usw. der Fall war, die klinischen Erscheinungsformen nachzuahmen schien. [Siehe auch Georgopoulos²⁾.]

Ein Hund von etwa 5 kg erhielt am 1. Tage eine Injektion von 1 ccm einer 2^o/_oigen Urannitratlösung. Da sich bis zum 3. Tage außer einer beginnenden Eiweißausscheidung im Harn keine äußeren Krankheitserscheinungen zeigten, erhielt das Tier abermals eine Injektion von 1 ccm. Am 5. Tage ausgeprägte Symptome einer Nephritis: 3^o/_o Eiweiß im Urin, im Sediment Massen von Cylindern; Harnentleerung bisher normal. Am 6. Tage erbrach das Tier wiederholt und wurde von da ab auch einige Male von deutlichen Krämpfen befallen. Vom 7. Tage an wurde spontan kein Harn mehr gelassen; auch der Katheder entleerte nur einige Tropfen. Der Tod des Tieres erfolgte am 9. Tage nach der 1. Injektion. Die Blutuntersuchung ergab vor der Vergiftung:

28,8% CO₂, am 8. Tage: 18,3% CO₂,

Ein analoger Versuch an einem Tier von 18 kg ergab bei der Anfangsbestimmung:

35,8% CO₂, kurz vor dem Tode: 23,0% CO₂.

Dieses Tier jedoch bedurfte einer 5maligen Injektion von 1 ccm Urannitratlösung, bis sich deutliche Zeichen einer schweren Nephritis bemerkbar machten. Auch sonst erwies sich das Tier als sehr wider-

¹⁾ P. F. Richter, Berl. klin. Wochenschr. 384, 1905.

²⁾ Georgopoulos, Zeitschr. f. klin. Med. 60, 411, 1906.

standsfähig, da es erst am 18. Tage ad exitum kam. Krämpfe wurden bei ihm nicht beobachtet, und ein völliges Versiegen der Harnabsonderung trat nicht ein.

Also auch in diesen beiden Versuchen zeigt sich ein deutliches Absinken der Blutalkalescenz; immerhin kann man hier im Zweifel sein, ob da nicht doch besondere Einflüsse der Uranvergiftung in Betracht zu ziehen sind; bei dem zweiten Tiere scheint mir auch eine Inanitionsacidose nicht ausgeschlossen, da es in den letzten 10 Tagen keine feste Nahrung mehr aufnahm und auf 14 kg abgemagert war. Trotz der Zweifel schien mir die Mitteilung dieser beiden Versuche von einigem Interesse.

Zusammenfassend möchte ich nun nochmals hervorheben, daß die von Morawitz vorgeschlagene Methode zur Alkalescenzbestimmung des Blutes sich nach meinen Erfahrungen sehr wohl anwenden läßt und weiteren Nachprüfungen empfohlen werden kann.

Meine eigenen Untersuchungen bestätigten die Tatsache, daß die Aufnahmefähigkeit des Blutes für CO_2 bei experimenteller Urämie herabgesetzt ist, woraus wir auf eine Säuerung schließen dürfen.

Will man jedoch die experimentelle Urämie nicht mit der klinisch beobachteten auf eine Stufe stellen, so darf man auch diese bei beiden beobachteten Säuerung nicht mehr als ätiologisch wesentliches Moment betrachten, sondern muß sie nur als begleitendes Symptom auffassen.

Beobachtungen an Leukocyten bei Variationen der Ionenkonzentration.

Von

Fritz Schwyzer.

(Eingegangen am 23. Februar 1914.)

In meinem Artikel (II.) über die Oberflächenspannung der Leukocyten und deren Beeinflussung (diese Zeitschr. 60, 306, 1914) habe ich den Nachweis zu bringen versucht, daß die Oberflächenspannung, und damit die Form der weißen Blutkörperchen, hauptsächlich von den kontaktelektrischen Verhältnissen abhängen. Ich möchte nun einige Versuche anführen, die beweisen, daß die Formveränderungen der Leukocyten ganz besonders durch die OH^- - und die H^+ -Konzentration bedingt sind. Schon Rhumbler¹⁾ und Verworn²⁾ haben die Bildung von Pseudopodien und deren Einziehung durch Oberflächenspannungsveränderung erklärt. Letzterer glaubt, daß Sauerstoffionen, die auf die Oberfläche aufstoßen, Pseudopodienbildung veranlassen.

Die Oberfläche der Leukocyten könnte als eine aus einem reversiblen Gel bestehende Membran aufgefaßt werden, die gewissermaßen verstärkt ist durch Lipoidgehalt, Lecithin oder ähnliches. Durch diese Membran findet der osmotische Austausch statt, die Aufnahme und Abgabe von Produkten der Blutflüssigkeit und der weißen Blutkörperchen. Bei der Intensität der chemischen Umsetzungen in Protoplasma und Kern der Leukocyten müssen wir einen sehr regen Stoffaustausch erwarten, und die Lipoidschicht läßt beträchtliche osmotische Spannungsdifferenzen auf beiden Seiten erwarten, da sie den

¹⁾ Rhumbler, Zur Theorie der Oberflächenkräfte der Amöben. Zeitschr. f. wiss. Zool. 83, 1905 u. ff.

²⁾ Verworn, Die Bewegung der lebenden Substanz. Jena.

Ionen größere Widerstände entgegensetzt. J. Hamburger (zitiert in II.) hat lipoidlösende Agenzien als das beste Reizmittel zur Phagocytose erkannt und damit die Wichtigkeit des Lipoidgehaltes betont. Ich möchte nun auf die hohe Bedeutung der OH^- -Ionen für die Lipoidschicht hinweisen. Alle Zeichen erhöhter Leukocytenaktivität, wie Pseudopodienbildung (und auch Phagocytose), können im Experiment durch Erhöhung der OH^- -Konzentration hervorgerufen werden, gerade so gut wie sie Hamburger für die Lipoidlösungsmittel beschreibt. Die Annahme, daß auch die Erhöhung der OH^- -Konzentration lipoidlösend oder ähnlich wirkt, ist daher fast selbstverständlich. Jedenfalls werden die Nässungsverhältnisse der Leukocytenoberfläche durch OH^- -Ionen stark verändert — sehr erhöht — und damit die Oberflächenspannung vermindert.

Es ist bekannt, daß durch H^+ -Wirkung, innerhalb biologischer Grenzen, die Leukocyten scharfe, runde Konturen annehmen, daß Säure die Zelloberfläche scharf zeichnet, während Alkali leicht verwaschene Bilder zustande bringt (z. B. Auflösung der Leukocyten bis zum Kerne in ammoniakalischem Harne). So produziert also erhöhte H^+ -Konzentration kugelige Leukocyten, die z. B. die Ebene des Objektträgers nur mit einem Punkte berühren, während OH^- -Konzentration unregelmäßige Formen ergeben muß, die am Glase, und an anderen Fremdkörpern, leichter haften. Die Geschwindigkeit der Formveränderung wird vielleicht noch leichter verständlich, wenn man die spumoide Struktur¹⁾ des Protoplasmas berücksichtigt, nach der Änderungen in der äußeren Ionenkonzentration auch auf die innere wirken und dadurch die Oberflächenspannung eines jeden Spumoidteilchens beeinflussen müssen.

Die Formverschiedenheit usw. der Leukocyten läßt sich aus folgenden Versuchen leicht ersehen:

1. Fließen durch Deckglasapillarräume.

Ich legte ein Deckglas von 16/22 mm auf ein solches von 18/27 mm, so daß das um 5 mm größere Deckglas auf der einen Seite einen freien Rand von 5 mm bekam und an den

¹⁾ Siehe L. Rumbler, Das Protoplasma als physikalisches System. *Ergebn. d. Physiol.* 14, 474 bis 617, 1914.

Längsrändern auf jeder Seite einen Streifen von 1 mm. In dieser Stellung wurden die Deckgläser mit ziemlich kräftigem Druck festgehalten durch eine Schieberdeckglaspinzette. Dann wurden die Längskanten des kleineren Deckglases an das größere festgeklebt durch Paraffin und nachher mittels glühender Platinöse das Paraffin erhitzt und durch Capillarität so eingezogen, daß in der Mitte ein Längscapillarraum von ca. 8 mm Breite den ganzen Raum zwischen den zwei Deckgläsern durchzog. Den freien Rand des größeren Deckglases benutzte ich als Mischstelle. Das mit Zusatzflüssigkeit (in 9⁰/₀ NaCl) [ää] gemischte Blut fließt in einer Schicht so weit als das kleine Tröpfchen reicht. Der Streifen wurde dann durch Striche mit Tusche in drei gleiche Teile geteilt, in einen vorderen, mittleren und hinteren, und dann wurden in jedem Streifen die Leukocyten gezählt (meist Querstreifen von 2 Gesichtsfeldbreiten von Zeiß, Obj. E). Wie zu erwarten war, nach der Leukocytenbeobachtung bei den Geldrollenversuchen, ergab sich eine bestimmte Säurekonzentration, bei der im dritten Raume die meisten und im ersten die wenigsten Leukocyten zu finden waren, und umgekehrt ein NaOH-Gehalt, bei dem die meisten Leukocyten im vordersten Raume deponiert waren. Das heißt: bei Erhöhung der OH⁻-Konzentration kleben die Leukocyten an Glasflächen leicht fest. Bei Erhöhung der H⁺-Konzentration scheinen sie die Fähigkeit, anzuhaften, zu verlieren.

2. Versuche über die Klebrigkeit der Leukocyten für Kohlepartikel.

Ähnliche Resultate ergeben sich, wenn man Blut mit Verdünnungsflüssigkeiten, die NaOH oder Säure in 9⁰/₀iger NaCl-Lösung, und in beiden Fällen Tusche enthalten, inkubiert. Nach ¹/₂ bis 1 Stunde zeigen die in vermehrtem Alkali gehaltenen Leukocyten auf ihrer Oberfläche viele Tuschepartikel, die der Säure ausgesetzt viel weniger. Diese Versuche verlangen freilich für jeden Leukocyten eine Beurteilung durch den Beobachter. Ich führe sie nur an, weil die Resultate mit der Tabelle über die Oberflächenspannung der Leukocyten schön übereinstimmen.

Bei den Capillardeckglasversuchen fand ich folgende Zahlen (als Beispiel):

Blut — 9 ⁰ / ₁₀₀ NaCl mit 1 ⁰ / ₁₀₀ NaOH:				
Vorderster Streifen	255	Polynucl. :	41	Lymphocyten
Zweiter	"	3	" :	6 "
Dritter	"	12	" :	4 "

Blut — 9 ⁰ / ₁₀₀ NaCl mit 0,5 ⁰ / ₁₀₀ H ₂ SO ₄ :				
Erster Streifen	32	Polynucl. :	13	Lymphocyten
Zweiter	"	18	" :	3 "
Dritter	"	12	" :	1 "
Ende		22	" :	2 "

In den Geldrollenpräparaten sind bei diesem Zusatz die Leukocyten noch nicht ganz rund, bei stärkerer Säurezugabe war der erste Streifen fast frei von Leukocyten.

Daß die OH⁻- resp. H⁺-Konzentration das Ausschlaggebende ist, konnte ich anscheinend deutlich genug nachweisen an Leukocyten, die den beiden metallischen Polen eines Leclanchéelementes ausgesetzt waren, in einer 9⁰/₁₀₀igen NaCl-Lösung, mit Tusche, für $\frac{1}{4}$ bis 1 Stunde bei 37°. Die Leukocyten vom negativen Pol waren mit Tuschpartikeln besät, die vom positiven Pol zeigten bedeutend weniger anhaftende Partikel. Stärkerer Strom oder längere Versuchsdauer führten auf der negativen Seite (die von der positiven durch eine tierische Membran getrennt war) zur Auflösung der Leukocyten.

8. Blutabstrich auf dem Objektträger.

Es ist mir früher oft aufgefallen, daß die Leukocytenverteilung in Streichpräparaten eine ungleichmäßige ist. Wird ein Tropfen Blut unter einem Winkel von ca. 60° mittels eines anderen Objektträgers über einen fein geschliffenen, sorgfältig gereinigten Objektträger so ausgestrichen, daß der Scheitel des Winkels die Strichrichtung andeutet, so wird der Tropfen in dem von zwei Glasflächen begrenzten Raum gehalten und gegen die beiden Kanten des Objektträgers durch Capillarität am Ausfließen verhindert, falls die Flüssigkeitsmenge nicht zu groß ist. Wenn nun die roten und die weißen Blutkörperchen gleiche Anklebefähigkeit besäßen, müßten sie auch gleichmäßig an der bestrichenen Glasplatte haften, so daß, sagen wir, auf 1000 rote Blutkörperchen am Anfang des Striches, in der Mitte, und am Ende, je 1 Leukocyt oder Lymphocyt käme. Das ist aber durchaus nicht der Fall. Die ersten 50 qmm enthalten viel-

leicht 1 Leukocyten auf 5000 rote Blutkörperchen, die letzten 50 qmm 1 Leukocyten auf ca. 300 bis 500. Am Ende des Ausstriches finden sich fast nur polynucleäre Leukocyten, so daß auf den ersten flüchtigen Blick das Präparat an dieser Stelle an ein Leukämiepräparat erinnert.

Fragen wir uns nach dem Grunde dieser verschiedenen Blutverteilung, so denken wir wohl vor allem an die Unterschiede in der Größe. Mit dieser Erklärung habe ich mich früher abgefunden, bis ich folgende Überlegung anstellte: Der abzustreichende Tropfen Blut verteilt sich zwischen den zwei Objektträgern ungefähr in der Form eines Prismas, dessen Durchschnitt ein gleichseitiges Dreieck darstellt. Dabei figurirt als 3. Fläche die freie Oberfläche des Bluttröpfens (die allerdings nicht eine Ebene darstellt).

Die Länge dieses Prismas hängt ab vom Blutquantum, vom Winkel, unter dem der Objektträger aufgesetzt wird, von der Reinheit und Feinheit der Oberflächen (die leiseste Spur einer fettigen Substanz vereitelt bekanntlich den Strich), von der Viscosität des Blutes und dessen adhäsiven Qualitäten gegenüber Glas, vielleicht sogar gegenüber dem speziellen Glas. Ist nun am oberen und am unteren Objektträger eine Berührungsfäche mit dem Blute entstanden, so werden diejenigen Blutkörperchen, die in diesen geometrischen Ebenen liegen, am Glase ankleben. Die anderen Partien des Blutes bleiben beweglich. Wird nun der obere Objektträger auf dem unteren verschoben in der Richtung des Winkelscheitels, so wird dem Blutprisma zwar oben immer die gleiche Glasfläche anliegen, unten aber stets eine frische. Folglich muß unten neues Blut ankleben, so daß das Prisma quasi abgerollt wird. Dabei wird immer dasjenige Blut ankleben, das zu innerst im Winkel sich befindet, und, da sonst ein Vakuum entstände, muß das Blut entlang der Klebefäche des oberen Objektträgers stets nachfließen, gegen den Winkelscheitel hin. Daher die rollende Bewegung. Gegen das Ende hin wird das Prisma immer dünner; schließlich löst es sich in die letzten feinsten Tröpfchen auf, die, der Strichrichtung folgend, linear auseinandergezogen werden. Wie oben bemerkt, enthalten diese letzten Streifen des Ausstriches relativ die größte Menge von Leukocyten. Da nun die Polynucleären 10 bis 12 Mikra messen und die Erythrocyten

bloß 7, so können die ersteren unter dem Einfluß der Flächenattraktion der beiden Glasflächen weiter geschleppt werden als die letzteren. Dann aber müßten die Leukocyten gegen den Schluß hin nur durch große Formen vertreten sein, resp. die großen Polynucleären müßten stark im Prozent überwiegen. Ich machte ausgedehnte Reihen von Zählungen dieser Art, die ich unten näher besprechen will. Jetzt sei nur erwähnt, daß die Polynucleären zwar an Prozent mehr zunehmen als die kleinen mononucleären Formen, daß aber auch die letzteren in absoluten Zahlen gegen den Schluß meist vermehrt sind. Um die Bedeutung des mechanischen Elementes beim Abstrich festzustellen, setzte ich den oberen Objektträger unter verschiedenen Winkeln auf. Ich strich von demselben Blute unter mechanischer Führung, mit drei verschiedenen Winkeln, unter 20°, 40° und 60° Strichwinkel. Bei allen drei Winkeln zeigte sich die Anreicherung gegen das Strichende hin. Es scheint dabei ganz gleichgültig zu sein, ob der streichende Objektträger mit einer scharfen, glatt geschliffenen Kante die bestrichene Fläche berührt, oder ob diese rund geschliffen ist.

Beispiel: Ein Blutabstrich (Menschenblut) wurde durch Querstriche in 9 gleiche Teile eingeteilt und dann wurden in jedem Teil 2 Querfelder von der Breite des Gesichtsfeldes des Zeiß-Immersionssystems (2 mm, 130) auf die poly- und mononucleären Zellen gezählt.

Teil	Mono.: Poly. (mit Übergangsformen)	Total	Prozent Mono.: Poly.
1	8 : 20	28	28,5 : 71,5
2	20 : 42	62	32,0 : 60,0
3	20 : 25	45	44,0 : 56,0
4	36 : 31	67	55,0 : 45,0
5	16 : 17	33	50,0 : 50,0
6	18 : 13	31	58,0 : 42,0
7	40 : 151	191	28,0 : 74,0
8	34 : 127	161	21,0 : 79,0
9	35 : 170	205	17,0 : 83,0
		Mittel	27,5 : 72,5

Ein Abstrich von Mäuseblut, in 4 Teilen, sonst wie oben gezählt, ergab:

1	20 : 110	15,4 : 84,6
2	15 : 118	11,4 : 88,6
3	24 : 129	15,7 : 84,3
4	18 : 234	7,8 : 92,2

Bei Abstrich auf einem Objektträger von ca. 55° war der Prozentsatz:

anfangs . . .	15,6	mono.	zu	84,4	poly.	usw.
dann	16,4	"	"	83,6	"	"
am Schlusse .	7,6	"	"	92,3	"	"

Die absoluten Zahlen zeigten am Schlusse nur geringe Vermehrung. Ich will nicht leugnen, daß das mechanische Element bei der Leukocytenverteilung auf dem Ausstrich eine Rolle spielt, aber ich muß auch die Ionenwirkung hervorheben. Wie wir schon in dem ersten Kapitel (über Geldrollenbildung usw.) gesehen haben, stört Berührung mit Glas die Ladungsverhältnisse der Blutkörperchen, indem ein Teil der vorhandenen OH-Ionen sich an die Glasfläche lagert. Das Abrollen des Blutprismas über die Fläche des Objektträgers wird so zu einem relativen Überwiegen der H⁺-Ionen in dem Blutströpfchen führen und dadurch zu einer Erhöhung der Oberflächenspannung der Leukocyten. Infolge ihrer kugeligen Form werden sie weniger leicht ankleben und erst mit den letzten Resten der Blutflüssigkeit abgelagert werden.

Zusammenfassung.

Ich glaube, in obigem einige Beweise geliefert zu haben, daß die Oberflächenspannung auf das innigste mit der Ionisierung zusammenhängt. Innerhalb vitaler Grenzen erhöht die OH-Konzentration die vitalen Vorgänge der Leukocyten, die Pseudopodienbildung usw. und bringt wohl auch eine Erhöhung der chemischen Umsetzungen zustande durch Erniedrigung der Oberflächenwiderstände sowohl außen, als in der Zelle selber, zwischen den Spumoidkörperchen. Erhöhung der H⁺-Konzentration erhöht die Oberflächenspannung der Leukocyten (und anderer lebender Zellen!). Damit nehmen die Leukocyten mehr die Form einer Kugel an, die Nässungsverhältnisse gegenüber der Blutflüssigkeit werden ungünstiger, wohl auch im Innern des Spumoidgebildes, und die chemischen Umsetzungen dürften reduziert werden. Die Nutzenwendung dieser theoretischen Erwägungen wollen wir in einem folgenden Artikel ziehen.

Die Rolle der Leukocyten beim Entzündungsphänomen, ein kontaktelektrisches Problem.

Von

Fritz Schwyzer.

(Eingegangen am 23. Februar 1914.)

Die Hauptsymptome der Entzündung sind Hyperämie mit Schnellerwerden des Blutstromes, Randstellung und Emigration der Leukocyten, Anhäufung derselben im Entzündungsherde, Vorgänge progressiver und regressiver Natur in den Bindegewebelementen, den Leukocyten und anderen Zellen des Herdes, die eventuell zu Verflüssigung — Abszeß — führen. Viele Erscheinungen dieses Vorganges werden als „vital“ bezeichnet, für andere liegen rein physikalische Erklärungen vor. Der Unterschied des spezifischen Gewichtes — Leukocyten sind leichter als rote Blutkörperchen — wird beim Schnellerwerden des Blutstromes die ersteren an die Gefäßwand hindrängen (in den Poiseuilleschen Raum). Die Beschleunigung des Blutstromes, eine Folge aktiver Arterienerweiterung und passiver Dehnung der Capillaren, soll vom Gefäßnervensystem abhängen und eintreten, nach Gaskell¹⁾ durch Erhöhung des Säuregehaltes der Gewebe (z. B. Milchsäure), nach Severini²⁾ durch vermehrte CO₂-Spannung, und nach Vincent und Sheen³⁾ durch den erhöhten Gehalt des Herdes an Gewebsextrakten. Die Rolle der Leukocyten bleibt unerklärt. Ihre Randstellung im strömenden Blute ist anscheinend ihre letzte physikalische Tat, das Ankleben an der Gefäßwand, an der sie sonst nicht haften,

¹⁾ W. H. Gaskell, Journ of Physiol. 1, 108 und 262, 1878; 3, 48, 1880.

²⁾ L. Severini, La contrattilità dei vasi capillari etc. Perugia 1881.

³⁾ Vincent and Sheen, Effects of extravascular injections of extracts of animal tissue. Journ. of Physiol. 19, 242, 1903.

das schwierige Durchwandern und das zielbewußte Kriechen nach einem Herde hin möchte einen fast an ein Überbleibsel aus dem 19. Jahrhundert denken lassen, an die Lebenskraft. Selbst wenn man die Erscheinung eine chemotaktische nennt, also ein Angezogenwerden durch chemische Einflüsse, so erhält der Leukocyt doch die Rolle eines selbständigen Wesens. Ich habe schon vor vielen Jahren diese Lücke empfunden und an elektrotropische Einflüsse gedacht, um so mehr, als, wie allgemein bekannt, der entzündliche Herd elektrisch negativ reagiert gegenüber dem ruhenden Gewebe. Dieser Idee folgend studierte ich mit E. Blasius¹⁾ die elektrotropischen Erscheinungen zuerst an Fischen und anderen Wirbeltieren, und an Insekten, und setzte später diese Untersuchungen an niedrigen Tieren fort, an Protozoen, besonders Amöben und Infusorien. Unterdessen wurden viele Arbeiten publiziert über elektrotropische Erscheinungen an Protozoen usw., so daß ich mich später auf Versuche mit Leukocyten beschränkte. Es gelang mir aber nie, typischen Elektrotropismus an weißen Blutkörperchen nachzuweisen, und die Arbeiten von Dineur²⁾ konnte ich nicht als einwandfrei auffassen. (Er fand, daß der normale Leukocyt sich gegen den positiven Pol richtet, der Leukocyt aus entzündlichem Gewebe nach dem negativen; als ob die Leukocyten zwei verschiedene Charaktere hätten.) Die Methoden Dineurs waren viel zu grob. Derartige Beobachtungen bei Leukocyten sind sehr schwierig. Was schon bei Protozoen schwer hält, wird bei den weißen Blutkörperchen fast unmöglich; Beobachtungen mit starken Vergrößerungen auf warmem Objektträger unter Stromzuführung durch unpolarisierbare Elektroden, wobei der Leukocyt möglichst bewegungsfrei erhalten werden muß, unter Vermeidung von Beeinflussung durch Objektträger, Deckglas und andere Fremdkörper. Der hängende Tropfen wäre geeignet, aber Beobachtung mit starken Linsensystemen ist dabei unmöglich, weil die Leukocyten in die untere Schicht des Tropfens und außer Fokaldistanz des Mikroskopes sinken. Dafür gelangen sie in die Zone der Oberflächenspannung des

¹⁾ Blasius und Schwyzer, Arch. f. d. ges. Physiol. 53, 493, 1893.

²⁾ E. Dineur, Recherches sur la sensibilité des Leucocytes à l'Électricité. Annales d. l. Soc. Royale d. Sciences méd. et natur. de Bruxelles 1, 1 bis 14, 1892.

Tropfens. Dort spielen die Wasserverdunstung resp. Wasseraufnahme in der feuchten Kammer eine nicht kontrollierbare Rolle. Ich habe auf derartige Versuche resultatlos viel Zeit verwendet. Von den früheren Autoren möchte ich speziell Ludloff¹⁾ hervorheben. Er fand, daß die Anode bei Paramäcium eine contractorische, die Kathode eine expansorische Erregung hervorruft. Auch ich konnte mich häufig überzeugen, daß Paramäcien den Pol richtig angeben. Die Erklärung der Leukozytenmigration durch elektrische Einflüsse wurde mir durch diese Arbeit noch um so wahrscheinlicher. Mit der weiteren Entwicklung der Physiologie auf physikalisch-chemischer Basis ist ja die Lehre von der potentiellen Energie des lebenden Gewebes, ganz besonders in den Tatsachen der Oberflächenspannung, allgemein angenommen worden. Meine weiteren Versuche, zuerst mit dem klassischen Entzündungsversuch, hatten kein Resultat. Ich ließ durch unpolarisierbare Elektroden schwache galvanische Ströme auf das Mesenterium einwirken. Frösche und Warmblüter zeigten Leukozytenauswanderung usw., aber keine deutlichen polaren Differenzen. Auch an so behandelten und rasch fixierten Geweben konnte ich in Schnitten keine polaren Unterschiede finden. Die Vorgänge bei der Härtung (chemisch oder thermisch) sind derart, daß Pseudopodien selten erhalten bleiben. Die absterbenden Leukozyten haben immer noch Zeit, sich auf Kugelform zu kontrahieren.

Aus den Tatsachen der Physiologie und Physik möchte ich zwei Gesetze hervorheben, die auch das Entzündungsphänomen betreffen: 1. Das Gesetz von der negativen Schwankung gereizten oder veränderten Protoplasmas dem ruhenden gegenüber. In der gereizten Stelle der lebenden Substanz wird die Konzentration der Elektrolyten, sagen wir vorläufig durch differentiellen Chemismus, verändert gegenüber der nicht gereizten Umgebung. Erhöhte Konzentration der Elektrolyten auf der einen oder der anderen Seite führt durch den osmotischen Druck den Transport von Ionen herbei vom konzentrierten zum weniger konzentrierten Medium. Und dabei bedingt nach der Theorie von Nernst eine Verschiedenheit in der Wandlungsgeschwindigkeit der positiven und negativen Ionen Ver-

¹⁾ K. Ludloff, Untersuchungen über Galvanotropismus. Arch. f. d. ges. Physiol. 59, 525 bis 554, 1895.

schiedenheiten der Potentiale. Das erwähnte Gesetz gilt für Pflanzen sowohl als für Tiere. Bei Blättern macht schon die Belichtung eine Potentialdifferenz von 0,02 Volt gegenüber den beschatteten Stellen (A. D. Waller). Die bekannten Verletzungsströme bei Äpfeln dagegen beruhen auf größeren Verhältnissen, sie sind nicht Konzentrationsströme, sondern werden durch chemische Reaktionen erklärt (J. Loeb und R. Beutner¹⁾. Wenn schon ein Blatt solch beträchtliche Potentialdifferenzen aufweisen kann, so ist es begreiflich, daß bei einem größeren Entzündungsherde ganz bedeutende potentielle Unterschiede entstehen können zwischen dem Blute einerseits, welches das Röhrensystem des Herdes durchfließt, und dem gereizten und absterbenden Gewebe andererseits. Ich fand eine Differenz von fast 0,1 Volt, und zweifle kaum, daß sich noch größere Unterschiede finden ließen. Diese elektrischen Erscheinungen sind übrigens nicht die einzige Form, in der durch Reizung Energie frei wird. H. Thiessen²⁾ fand durch thermoelektrische Messungen an Kartoffelknollen, Mohrrüben, Äpfeln usw., daß nach Verletzungen eine Wundwärme auftritt, deren Maximum von 0,02 bis 0,08° 1 Stunde (im Durchschnitt) nach der Verletzung eintritt, und die $\frac{1}{2}$ bis 3 Tage andauert. Er leitet die Wundwärme ab von der erhöhten Lebenstätigkeit, verursacht durch den Reiz. Die erhöhte Atmung erreicht ihr Maximum aber erst nach 3 Tagen, so daß diese allein nicht die Wärmesteigerung erklärt.

2. Das Gesetz von Quincke (Annalen der Physik und Chemie 513, 1861). Eine Flüssigkeit, die durch ein Rohr strömt, erwirbt eine Potentialdifferenz gegenüber der Rohrwandung. Umgekehrt führt ein elektrischer Strom, der ein mit Flüssigkeit gefülltes Capillarrohr durchzieht, zu einem Gleiten dieser Flüssigkeit gegenüber der Capillarwand (oder bei porösem Diaphragma gegenüber dem Material, aus dem dasselbe besteht). Auf dieses Gesetz hat v. Helmholtz, wie in Artikel I erwähnt, in seinen „Studien über die elektrischen Grenzschichten“ die Theorie der Kontaktelektrizität aufgebaut. Er fand das Quantum der durchgetriebenen Flüssigkeit pro-

¹⁾ J. Loeb und R. Beutner, Ursachen des Verletzungsstromes des Apfels. Diese Zeitschr. 44, 303, 1912.

²⁾ H. Thiessen, Beiträge z. Biol. d. Pflanzen 10, 53 bis 106, 1912. Biochemische Zeitschrift Band 60.

portional dem Produkt von elektromotorischer Kraft mal Querschnitt der Capillare, oder des porösen Diaphragmas, und unabhängig von der Länge der Röhre oder der Dicke des Diaphragmas. Dabei wurde noch ein besonderer Faktor eingesetzt für das Kontaktelektrisiervermögen des speziellen Diaphragmas und der betreffenden Flüssigkeit. Eine Glasröhre wird von durchfließendem Wasser negativ geladen, das Wasser positiv, und die positiven Ionen werden mit dem Strome fortgetrieben, so daß ein Galvanometer im Wasser einen positiven Strom im gleichen Sinne anzeigt, wie der Wasserstrom. Alkalisirtes Wasser, das ein Sanddiaphragma unter 1 Atmosphäre Druck durchfließt, gibt eine Spannung von 6 Volt. So müßte also im strömenden Blute eine Verschiebung von Ionen stattfinden und die Gefäßwand die entgegengesetzte Ladung aufweisen. Da jeder Körper, selbst ein isolierender, Ionen enthält, so muß bei Berührung mit einem anderen Körper stets eine Ionenverschiebung statthaben. Ein Gleichgewicht könnte nur bestehen, wenn beide Körper alle Ionen genau in der gleichen Proportion enthielten.

Aus den zwei Gesetzen können wir für die Entzündungslehre folgendes schließen: Normalerweise findet im strömenden Blute eine Bewegung der positiven Elektronen in der Richtung des Blutstromes statt. In der Nähe eines Entzündungsherdens wird das Blut schneller fließen — zu Anfang —, daher ist es als etwas positiver aufzufassen. Der Herd selber, als „verändertes“ lebendes Gewebe, wird dagegen negativer — also das Potentialgefälle verstärkt. Die Stoffwechselprodukte des entzündeten Herdens werden durch die feinen Capillarwände osmotisch an das Blut abgegeben. Als Austauschfläche ist die Endothelschicht anzusehen, und zwar die Oberflächenschicht gegen das Gefäßlumen. Dort ist also die Grenzschicht zwischen OH^- - und H^+ -Konzentration. Fassen wir die innerste Oberfläche auch als „lebende Substanz“ auf, so muß durch den osmotischen Druck der Reizprodukte auch diese Schicht negatives Potential erwerben — damit werden die Nässungsverhältnisse besser, die innerste Flüssigkeitsschicht im Poiseuilleschen Raum wird durch Flächenattraktion festgehalten — die Reibungs- resp. Grenzschicht rückt in den Poiseuilleschen Raum. Wenn nun infolge der erhöhten Stromgeschwindigkeit die schwereren Erythrocyten gegen die Stromachse hindrängen und die leichteren Leuko-

cyten nach der Wand hin gepreßt werden, so müssen die letzteren unter den Einfluß der OH-Spannung kommen. Folglich wird ihre Oberflächenspannung herabgesetzt — statt der Kugelform werden sie amöboid, die Oberfläche wird quasi klebrig — die Leukocyten kleben an. Die roten Blutkörperchen haben viel geringere Variabilität der Form, und sie sind, wie gesagt, durch ihr höheres spezifisches Gewicht auf die Region der größten Stromgeschwindigkeit gewiesen.

Über die kontaktelektrischen Verhältnisse der Blutplättchen will ich hier nicht sprechen. Eine Beobachtung aus der Entzündungslehre aber soll hier erwähnt sein: Schon zu Anfang des Entzündungsphänomens tritt ein feinstes albuminöses Überzug der Endotheloberfläche auf, der wohl viel zum Haften der Leukocyten beiträgt. Es scheint mir wahrscheinlich, daß unter Einfluß des veränderten Potentials Proteidkolloide ausfallen und auf der Endothelschicht abgelagert werden.

Die Anreicherung an Leukocyten im Entzündungsgebiet ist bekannt. Aus dem geröteten Hofe einer kleinen eitrigen Kratzwunde fand ich bei Blutzählung 15 560 Leukocyten gegenüber 10040 aus normalem Gebiet desselben Menschen. Bei dem gleichen Individuum, aber aus der Umgebung einer reaktionslosen Abrasion, fand ich 10444 Leukocyten. Bei Mäusen und Ratten machte ich viele vergleichende Zählungen, indem ich durch Abschneiden der Schwanzspitze zur ersten Zählung Blut gewann und nach 1 oder 2 Tagen aus der Nähe der Wunde wieder zählte. Ich bekam den Eindruck, daß die lokale Blutzählung nicht bloß im allgemeinen angibt, ob das Gebiet einer Wunde gereizt ist, sondern wahrscheinlich auch qualitative Reizunterschiede erkennen ließe. Selbst die frische Verletzung beeinflußt die Leukocytenzahlen: im ersten Moment ergibt die Zählung weniger als nach 30 Sekunden. Quetschung des Schwanzes einer Maus ergab höhere Werte (bis zu 3000 Leukocyten mehr) als möglichst reizlose Blutentnahme.

Ich mache Versuche, die Ionisierung, die in jedem Entzündungsherde stattfinden muß, künstlich nachzuahmen, indem ich unter normalen Verhältnissen einzelne Gebiete unter den Einfluß von elektrischem Potential setzte, und dann Blutzählungen vornahm. Ich verwendete in erster Linie dazu Ratten und Mäuse und setzte die Tiere in Blechschachteln, die

mit in 9^o/₁₀₀iger NaCl-Lösung getränkter Leinwand ausgekleidet waren. Der Schwanz wurde durch ein kleines Loch mit isoliertem Rande herausgezogen und konnte nun, nach Umwicklung mit benetzter Leinwand, unter den Einfluß des einen Poles einer galvanischen Batterie gesetzt werden, während die Schachtel den anderen darstellte. Dabei verwendete ich 1 oder 2 Leclanché-Elemente, also einen im Vergleich zum Widerstande sehr schwachen Strom, und zählte die Leukocyten meist nach 15 Minuten Strom. Die Resultate können im ganzen folgendermaßen zusammengefaßt werden:

Bei Ratten und Mäusen ist eine Beeinflussung der Leukocytenverteilung durch elektrische Einflüsse nachweisbar; das negative Potential erhöht die Zahl der Leukocyten, das positive vermindert sie gegenüber dem negativen. Zählungen ohne Elektrisierung wurden zur Kontrolle gemacht, und in der Regel war die Normalzahl die niedrigste, die positive schwankend (gleich oder etwas niedriger) und die negative meist die höchste. Ich will aber nicht verschweigen, daß einzelne Tiere nicht nach obigem Schema reagierten, sondern beiderseits gleiche oder in wenigen Fällen sogar umgekehrte Werte gaben. Der Grund für Abweichungen von obiger Regel dürfte in der oben erwähnten Reizwirkung liegen. Stärkerer elektrischer Strom wirkt irritierend, gleichgültig welcher Richtung. Bei drei Elementen waren die Polarwirkungen ungefähr gleich.

Auch an Menschen habe ich eine Anzahl von Versuchen mit dem galvanischen Strome angestellt. Ich benutzte als Elektroden Handschuhfinger aus Hirschleder mit 9^o/₁₀₀iger NaCl-Lösung benäßt, ohne Fingerspitzen und elektrisierte so z. B. den 3. und 4. Finger derselben Hand (Strom eines Elementes) 10 bis 20 Minuten lang. Ich fand bei verschiedenen Menschen

Kathodenfinger A	9800	Leukocyten	gegen	8100	Anodenseite
"	A	9719	"	"	7633
"	B	7656	"	"	7397

Bei Verwendung von drei Elementen dagegen

Kathodenfinger 6385, Anode 6500,

beim gleichen Falle bei einem Element

Kathodenseite 7656, Anode 7397,

ein anderes Mal " 8470, " 7446.

Die Emigration der Leukocyten ließe sich folgendermaßen erklären: Wenn die weißen Blutkörperchen die innere Gefäßwand belegt haben, so sind sie an der Grenzschicht des intensivsten Ionenaustausches. Wir wissen, daß die Membranen dem Austausch der Ionen hindernd entgegengetreten. Die kleinen Ionen passieren relativ leicht, die größeren schwierig, die negativen wohl rascher als die positiven.

Wir müssen uns dabei vorstellen, daß die aus lebenden Zellen bestehenden Membranen dichte und weniger dichte Stellen haben, z. B. dort, wo die Endothelien zusammenstoßen, weniger dicht sind, als in deren Zentren. Die Ionenströme werden diejenigen Stellen zum Durchtritte benützen, wo sie die geringsten Widerstände finden. So werden die leichter durchdringbaren Punkte jeweils durch konzentrierte Ionenströmungen gekennzeichnet sein, und, wo solch ein Strom, besonders von OH^- , auf die Leukocytenoberfläche trifft, wird event. ein Pseudopodium heraustreten. So kann man einen gewissermaßen richtenden Einfluß der Ionenkonzentration auf die Pseudopodien annehmen.

Wenn das Pseudopodium die Membran trifft, so läßt sich ein Durchwandern dadurch erklären, daß die Kolloide der Leukocyten mit den Membrankolloiden sich verbinden, sie verflüssigen und so den Weg öffnen. Mit der Verflüssigung der Kolloide wird sofort der Weg für die Elektrolyten freier, konzentrierterer Ionenstrom, rasches Vordringen der Pseudopodien ist die Folge. Nach dem Durchbruch des Leukocyten hört die Kolloidverflüssigung auf, es entsteht durch Berührung mit den Elektrolyten der Flüssigkeit wieder ein Gel aus dem Hydrosol, und das Loch ist „verheilt“.

Die weitere Bewegung der Leukocyten in den Gewebsspalten usw. wird wohl als Chemotaxis aufzufassen sein — eventuell wäre auch hier eine Polarisierung anzunehmen: die den negativen Elektronen ausgesetzte Seite kann Pseudopodien aussenden, die andere sich kontrahieren.

Der Blutdruck hat wohl nur sekundäre Bedeutung für die Leukocytenauswanderung, doch dürfte das Durchschlüpfen einzelner Erythrocyten im Anschluß an Leukocyten davon abhängen. Daß bei Lösung der Membrankolloide die elektrische Ladung eine Hauptrolle spielt, haben Henri und Isco-

vesco¹⁾ schon betont. Die Durchwanderung der Leukocyten geschieht nach dem gleichen Prinzip wie die Kolloidfiltration durch Membranen (das Durchwandern der Kolloidgranula), oder wie, ins Molekulare übersetzt, die Durchwanderung von Wasserstoff durch glühende Metallröhren. Auch dort verbinden sich die Wasserstoffmoleküle zuerst mit dem Metall und verflüchtigen sich dann wieder auf der äußeren Seite. So kommen wir in der Tat zu einer Bestätigung des Ausspruches von Ad. Oswald²⁾: Die Entzündung ist ein kolloid-chemisches Problem.

Zusammenfassend glaube ich folgende Hypothese der Leukocytenemigration aufstellen zu dürfen:

1. Die Randbewegung der Leukocyten, durch hydrodynamische Einflüsse bedingt, führt zu einer Fixation der Leukocyten auf der Endothelschicht durch Konzentration negativer Ionen.

2. Der Weg zur Emigration wird durch die Elektronenströme angedeutet, und die Pseudopodien werden durch diese Ströme in die schwächsten Stellen der Membranen gerichtet.

3. Der Durchtritt selber erfolgt nach einem kolloid-chemischen (bekanntem) Prinzip.

4. Die Leukocytenwanderung im Gewebe wird als chemotaktisch aufgefaßt, könnte aber auch durch Ionenwirkung erklärt werden.

5. Die Blutstromverlangsamung im zweiten Stadium der Entzündung könnte vielleicht auf Erhöhung der Viscosität des Blutes basieren und damit auch ein kontaktelektrisches Kolloidproblem darstellen.

¹⁾ Henri et Iscovesco, De la filtration des colloides à travers des complexes etc. *Compt. rend. Soc. Biol.* 61, 197, 1906.

²⁾ Ad. Oswald, Über Entzündung als kolloid-chemisches Problem. *Korr.-Bl. f. Schweiz. Ärzte* 40, 601 bis 609.

**Über die fermentative Hydroperoxydzersetzung.
(Zugleich Bemerkungen zu der Arbeit von L. Michaelis und
H. Pechstein: „Untersuchungen über die Katalase der Leber“.)**

Von

P. Waentig und O. Steche.

(Aus dem Laboratorium für angewandte Chemie der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 25. Februar 1914.)

In Bd. 53, S. 320 ff. dieser Zeitschrift haben L. Michaelis und H. Pechstein eine Untersuchung veröffentlicht, in der sie sich auch mit unseren Arbeiten über Katalase¹⁾ beschäftigen. Durch Zufall ist diese Untersuchung uns erst kürzlich bekannt geworden. Wir gehen deshalb erst jetzt auf einige Punkte ihrer Mitteilung ein, in denen sie unsere Angaben einer Kritik unterziehen.

Michaelis und Pechstein geben an, daß sie bei ihren Katalasepräparaten die von uns gefundene „Schüttelwirkung“ nicht haben beobachten können und zweifeln an der Bedeutung dieses Faktors überhaupt.

Hierzu ist zunächst generell zu bemerken, daß die Wirkung des Schüttelns, wie wir schon betont haben und wie weitere ausgedehnte Untersuchungen an Fermenten verschiedenster Herkunft durch Herrn cand. Zieger bestätigten, nicht bei allen Fermenten gleich stark zutage tritt. Es besteht nach unserer Auffassung naturgemäß eine Korrelation zwischen der Adsorptionskraft der Fermentlösungen und der Schüttelwirkung in dem Sinne, daß kräftig adsorbierende (im allgemeinen „starke“) Katalasen auch einerseits deutlichen absteigenden Gang, andererseits „Schüttelwirkung“ zeigen, und umgekehrt. Es wäre also ganz gut denkbar, daß M. und P. zufällig auf ein Ferment

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 72, 226, 1911; 76, 177, 1911; 79, 446, 1912; 83, 315, 1913.

gestoßen wären, das, wie es auch uns vorgekommen, die Schüttelwirkung von vornherein nur in geringem Maße erkennen ließ.

Außerdem ist aber aus den Angaben der Verfasser klar erkenntlich, daß bei ihren Versuchen die Schüttelwirkung gar nicht deutlich zur Beobachtung kommen konnte. Aus verschiedenen Gründen:

Erstlich handelt es sich bei ihrem Versuchsmaterial — soweit ersichtlich — um gealterte, mehrfach verdünnte Lösungen, die, wie wir betont haben (s. 3. Mitteil., S. 453 ff.), häufig unter partiellem Rückgang der Aktivität einen stabileren Zustand annehmen. Solche Fermentlösungen zeigen daher auch bei ruhendem Reaktionsgemisch keinen oder nur einen sehr unerheblichen „Gang“ der K-Werte, sie adsorbieren, wie wir vermuten, den in Lösung oder in Übersättigung befindlichen Sauerstoff nicht und können daher auch keine erhebliche Schüttelwirkung zeigen. Diese Verdünnungswirkung ist schon in unserer 1. Mitteilung besprochen worden; wir sind darauf in unserer 3. Mitteilung zurückgekommen. Sie besteht aber keineswegs, wie aus unserer 3. Mitteilung gefolgert werden könnte, in der Wirkung der in kohlenensäurehaltigem destilliertem Wasser vorhandenen Wasserstoffionen. Sondern sie tritt bei relativ reinen Fermentlösungen (Extrakte von Alkoholfällungen) gerade in CO_2 -freiem Wasser oft viel stärker auf als in kohlenensäurehaltigem. Einen deutlichen Beleg dafür liefert die folgende Tabelle I. Besonders starken und regelmäßig auftretenden Gang zeigen die frischen Extrakte von Insekten. Sie eignen sich deshalb besonders gut zum Studium der Schüttelwirkung (vgl. 3. Mitteil., S. 456 ff.). Die folgende Tabelle II soll zeigen, daß aber auch frische Leberextrakte die Schüttelwirkung sehr deutlich aufweisen können. Allerdings ist zu bemerken, daß die „Leber“ der Schnecken nicht völlig in Aufbau und Funktion der Wirbeltierleber gleichgesetzt werden kann. Hinsichtlich weiterer Belege verweisen wir auf die demnächst erscheinende Dissertation des Herrn cand. Zieger.

Ferner scheint uns aber auch die Versuchsanordnung der Autoren zur Konstatierung einer Schüttelwirkung nicht ausreichend. Wir haben ausdrücklich betont, daß wir nur beim Schütteln im Vakuum reproduzierbare Effekte erhalten haben, eine Methode, die von Michaelis und Pechstein durch das

Durchleiten eines indifferenten Gases (Wasserstoff) ersetzt wurde, dessen Wirksamkeit sie durch den an Blutlösungen beobachteten Erfolg bewiesen zu haben glauben. Hier handelt es sich aber offenbar um eine im Dissoziationsgleichgewicht befindliche chemische Verbindung, dort dagegen um eine Adsorption, und es ist bekannt, mit welcher Kraft Gase von Adsorbentien aufgenommen und festgehalten werden können.

Tabelle I.

Wirkung der Verdünnung mit CO₂-freiem und CO₂-haltigem destilliertem Wasser auf Leberkatalase¹⁾.

	Min.	a) Sofort untersucht	Min.	b) Nach 4 stünd. „Inkubation“
CO ₂ -haltiges dest. Wasser	1	23,69	1	21,89
	3	18,21	4	15,06
	8	10,41	9	8,60
	12	6,84	12	6,15
CO ₂ -freies dest. Wasser	1	22,90	1	24,40
	4	15,37	4	20,25
	8	9,81	8	14,65
	12	6,50	12	10,78

Tabelle II.

Schüttelwirkung bei Leberkatalase.

Helix pomatia-Leber, Gew. 1,142 g, mit 28,55 ccm H ₂ O verd. Geschüttelt.			Parallelversuch dazu.		
1 + 250 H ₂ O ₂ %/400					
t	KMnO ₄	K	t	KMnO ₄	K
1 ^{so}	11,25	508	3 ^{so}	7,08	493
3 ^{so}	8,90	584	5 ^{so}	5,60	499
5 ^{so}	6,80	680	7 ^{so}	4,45	521
8 ^{so}	4,40	680	9 ^{so}	3,50	563
11 ^{so}	2,75		11 ^{so}	2,70	
Desgl. ungeschüttelt.			Desgl. ungeschüttelt.		
1 ^{so}	8,60	455	1 ^{so}	11,15	465
3 ^{so}	7,30	383	3 ^{so}	9,00	551
6 ^{so}	5,60	332	6 ^{so}	6,15	343
9 ^{so}	4,45	286	9 ^{so}	4,85	297
11 ^{so}	3,90		12 ^{so}	3,95	

¹⁾ Extrakt der I. Alkoholfällung: Trockensubstanz 0,76%, Aschegehalt 0,11%, Verdünnung ca. 1:12500.

²⁾ Die nach der Reaktion I. Ordnung berechneten K-Werte sind mit 4843 multipliziert.

Den Herren Verfassern scheint es ferner gegen unsere Auffassung über die Bedeutung der Adsorption zu sprechen, daß sie, wenn sie Wasserstoffionen und Salzkonzentration festlegten, ohne Schütteln reproduzierbare Werte erhielten, obgleich von Versuch zu Versuch die sich aus dem Reaktionsgemisch entwickelnde Sauerstoffmenge verschieden war. Dies ist aber durchaus verständlich, wenn man bedenkt, daß trotz dieser, übrigens bei Anwendung ganz reiner Gefäße sehr geringen Unterschiede die Hauptmenge des Sauerstoffs bei ruhender Flüssigkeit stets im Reaktionsgemisch verbleibt. Da man nun wohl anzunehmen hat, daß bei der außerordentlich geringen Fermentmenge immer nur ein kleiner Teil des Gases wirklich adsorbiert wird (vgl. hierüber S. 464 ff. in unserer 3. Mitteilung), so sind de facto die Adsorptionsbedingungen in allen Versuchen die gleichen.

Wenn ferner die Herren Michaelis und Pechstein bei ca. 20° schon in ca. $\frac{1}{198}$ -H₂O₂-Lösungen und bei höheren H₂O₂-Konzentrationen in immer wachsendem Betrage eine irreversible Schädigung des Fermentes festgestellt haben, so stimmt dies vollständig mit unseren Erfahrungen überein (vgl. 3. Mitteilung, S. 487 ff.). Auch wir haben der Ansicht Ausdruck gegeben, daß es sich hierbei um eine Oxydation handeln könne. Nur glauben wir allerdings nicht, daß atomistischer Sauerstoff in Betracht kommt, denn bei der Zersetzung des Hydroperoxyds durch Katalase tritt ja bekanntlich gerade aktiver Sauerstoff in irgendwie nachweisbarer Menge nie auf. Es muß sich um einen der sog. Autoxydation ähnlichen Vorgang handeln. Daß aber außer dieser irreversiblen Schädigung auch eine reversible besteht, die sich eben nicht durch Oxydation erklären läßt, glauben wir wahrscheinlich gemacht zu haben. Denn wir haben gezeigt, daß diese reversible Inaktivierung bei den Fermentlösungen, bei denen sie überhaupt festgestellt werden kann, bei 0° in stärkerem Maße auftritt als bei 20°, während die „Oxydation“ natürlich bei steigender Temperatur mehr in den Vordergrund treten müßte. Dann aber ist die reversible Inaktivierung in gewissen Grenzen unabhängig von der Peroxydkonzentration, was sich nicht mit der Auffassung in Einklang bringen läßt, daß es sich hier um eine Oxydation durch den entwickelten Sauerstoff oder das Peroxyd handelt.

Es ist aber auch nicht möglich, wie dies die Herren Michaelis und Pechstein versucht haben, zur Erklärung unserer Befunde, die uns zur Annahme von Adsorptionsvorgängen veranlaßt haben, die Wirkung des im Wasser gelösten Kohlendioxids heranzuziehen. Denn Reaktionsgemische, in denen Ferment- und Peroxydlösung mit kohlenstofffreiem Wasser hergestellt waren, zeigen die Erscheinungen in genau gleicher Weise. Es ist daher nicht richtig, wenn die Verfasser sagen, daß wir zwar die Wirkung der Kohlensäure gekannt, sie aber nicht ausgeschaltet hätten¹⁾. Wir kannten die vorzüglichen, von Sörensen²⁾ ausgearbeiteten Methoden sehr wohl, trugen aber Bedenken, sie bei unseren Versuchen zu verwenden, bei denen wir ursprünglich auf eine Methode hinauswollten, die eigentliche Aktivität eines Organextraktes zum Zweck vergleichender Messung möglichst genau festzustellen. Denn die zur Feststellung der Wasserstoffionenkonzentration benutzten Salzlösungen beeinflussen die Geschwindigkeit und den Verlauf der Hydroperoxydzersetzung schon in weit geringerer Konzentration, als dies die Verfasser annehmen. Diese Wirkung reiner Neutralsalze, ebenso wie der sog. Puffergemische, tritt in ihrer vollen Stärke nicht momentan, sondern häufig erst allmählich ein (Inkubationsperiode)³⁾. Ein Blick auf die im folgenden mitgeteilten Versuche (Tabelle III bis V), zu deren Erläuterung es nach unseren früheren Mitteilungen keiner weiteren Worte bedarf, zeigt dies. Es geht ferner aus diesen Versuchen hervor, daß entgegen der Annahme der Verfasser Na_2SO_4 in geringer Konzentration immer, CH_3COONa gelegent-

¹⁾ Die Angabe von Michaelis und Pechstein, daß die H-Ionenkonzentration im Wasser durch CO_2 -Aufnahme aus der Luft um zwei Zehnerpotenzen schwanken könne, ist zwar richtig, wenn man die H-Ionenkonzentration völlig reinen Wassers mit der von mit Luft gesättigtem Wasser vergleicht, die Schwankungen zwischen normalem destilliertem Wasser und solchem, das von CO_2 befreit ist, betragen dagegen viel weniger, wie übrigens Pechstein selbst durch einen Versuch (vgl. diese Zeitschr. 58, 172) dargetan hat. Noch viel geringfügiger sind jedoch die Änderungen, die während eines Versuchs im ruhenden Reaktionsgemisch eintreten können.

²⁾ Diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

³⁾ Vgl. hierzu und zu dem Folgenden auch Senter, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 684, 1905.

Tabelle III.

a) Wirkung von Salzen auf Blutkatalase.

Reaktionstemperatur: 20°.

Konzentration des H₂O₂: ca. 1/300 n.

Salzkonzentration im Reaktionsgemisch: 1/320 n.

Min.	Ohne Zusatz	Min.	NaCl	Min.	NaNO ₃	Min.	NaClO ₃	Min.	Na ₂ SO ₄	Min.	Na ₂ SO ₄ (nach läng. Stehen)
1	18,62	1	23,15	1	22,76	1	16,25	1	15,94	1	16,56
3	12,88	3	18,90	3	21,36	3	14,53	3	20,25	3	12,55
6	7,17	6	18,00	6	20,07	6	12,92	6	5,85	6	8,72
10	3,38	10	7,25	10	18,38	10	11,72	10	2,05	10	5,28
	800		440		137		242		958		599
	848		541		90		170		941		527
	826		634		95		105		1041		544

b) Wirkung von Salzen auf Leberkatalasen¹⁾.

Reaktionstemperatur: ca. 20°.

Konzentration d. N₂O₄: ca. 1/300 n.

Salzkonzentration im Reaktionsgemisch: 1/1220 n.

	Min.	Ohne Zusatz	Min.	NaCl	Min.	Na ₂ SO ₄	Min.	Na-Acetat	Min.	NaNO ₃					
CO ₂ -haltiges destill. Wasser	1	17,45	270	1	20,45	159	1	20,81	251	3	18,11	385	1	21,02	154
	3	15,41	229	3	19,00	238	3	18,53	318	10	10,05	357	3	19,58	159
	7	12,48	223	7	15,25	245	7	13,85	304	15	6,66		7	16,90	166
	12	9,65		12	11,50		12	9,75					12	13,95	
CO ₂ -freies destill. Wasser	1	20,85	434	1	22,00	411	1	21,30	435	1	22,54	284	1	22,92	79
	3	17,07	405	3	18,10	359	3	17,43	343	3	19,77	314	3	22,10	55
	6 ²⁰	12,31	400	6	13,00	245	6	12,70	335	7	14,80	331	7	21,00	38
	12	7,41		12	9,80		12	8,63		12	10,10		12	20,10	

Tabelle IV.

Wirkung von 1/320 n-Natriumacetatlösung auf Leberkatalase (Extrakt der Alkoholfällung).

	Min.	Sofort untersucht	Min.	Nach 2 Stunden „Inkubation“		
Ohne Zusatz, CO ₂ -freies Wasser	1	13,75	548	1	17,10	395
	3	10,68	426	3	14,25	477
	6	7,92		6	10,25	
Mit Natriumacetat, CO ₂ -freies Wasser	1	19,65	494	1	21,20	248
	3	15,65	456	3	19,00	291
	6	11,42		6	15,53	

¹⁾ Extrakt der 2. Alkoholfällung: Trockensubstanz 0,45%, Aschengehalt 0,022%, Verdünnung: 1 : 12500.

Tabelle V.

Einfluß von Acetatgemisch auf die Leberkatalase ¹⁾.

H₂O₂-Konzentration: ca. $\frac{1}{900}$ n.

CH₃-COONa-Konzentration: $\frac{1}{50}$ n.

CH₃-COOH-Konzentration: $\frac{1}{6000}$ n.

	Min.	Ohne Zusatz		Mit Acetatgemisch					
				Min.	sofort untersucht		Min.	nach 2 Stunden „Inkubation“	
0°	1	21,33		1	20,55		1	23,43	
	3	15,80	651	3	16,30	503	3	20,40	299
	5	12,30	543	5	12,81	523	5	17,54	323
	8	8,55	526	8	9,25	471	8	14,50	269
	12	5,55	469	12	6,30	417	12	12,00	209
ca. 20°	1	20,55	669	1	20,75	608	1	22,55	424
	3	15,10	563	3	15,68	509	3	18,55	429
	5	11,65	562	5	12,40	521	5	15,20	429
	8	7,90	552	8	8,65	519	8	11,31	460
	12	4,75		12	5,36		12	7,40	

lich eine sehr beträchtliche Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bedingen, eine Tatsache, die schon Senter mitgeteilt hat. Bei längerer Einwirkung geht auch die Wirkung des Na₂SO₄ in eine Schwächung über. Die Wirkung des NaNO₃, die übrigens auch Chlorate und Perchlorate in ähnlich starker Weise zeigen, ist gleichzeitig angeführt mit Rücksicht auf die Vermutung von Michaelis und Pechstein, daß die Schwächung des Fermentes hier möglicherweise durch einen beigemenkten Eiweißkörper veranlaßt sein könnte. Sehr reine Katalaselösung wird danach ebenso stark geschwächt, als eine minder reine. Es ist übrigens sehr wahrscheinlich, daß die Zufügung des Puffergemisches ein weiterer Grund dafür ist, daß Michaelis und Pechstein die Schüttelwirkung nicht beobachtet haben. Denn mit der Schwächung der Aktivität geht meist eine Verbesserung der Konstanz der K-Werte, also (s. o.) eine Abnahme der Schüttelwirkung Hand in Hand.

Was die Beziehung zwischen Fermentkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit anlangt, so werden nach dem Dargelegten Unstimmigkeiten — falls solche wirklich zwischen unseren Angaben und denen der Verfasser bestehen — nicht so

¹⁾ Extrakt der 1. Alkoholfällung.

wohl auf Aufnahme und Abgabe von Kohlensäure zurückzuführen sein, als auf die durch die Zufügung der Puffergemische herbeigeführten Veränderungen der Fermentlösung¹⁾. U. E. besteht aber eine Unstimmigkeit wenigstens zwischen den Angaben Senters über diesen Punkt und unseren eigenen Befunden gar nicht. Denn wir haben auf S. 491 ff. unserer 3. Mitteilung ausführlich angegeben und begründet, daß, wenn man im Sinne Senters die K-Werte bei gleichen Phasen der Reaktion vergleicht, bei Zimmertemperatur Übereinstimmung mit den Senterschen Befunden sich ergibt, und ebenso dann, wenn man mit sehr geringen H₂O₂-Konzentrationen arbeitet. Daß andererseits, wenn eine irreversible oder reversible Inaktivierung des Ferments während der Reaktion stattfindet, und wenn man, um die Wirksamkeit des Ferments bei verschiedenen Konzentrationen zu vergleichen, die Zeiten in Betracht zieht, die den gleichen Umsatz herbeiführen, notwendigerweise bei niedriger Fermentkonzentration die Zeiten größer sein müssen, weil während der hierzu erforderlichen längeren Zeit *ceteris paribus* auch entsprechend mehr Ferment hat inaktiviert werden können, ist ohne weiteres klar. Der von Michaelis und Pechstein festgestellte Exponent *n* in der allgemeinen Gleichung:

$$\varphi^n \cdot t = f(x)$$

ist daher von diesen Verhältnissen abhängig und besitzt keine allgemeine Bedeutung.

Nach allem glauben wir, daß die Versuche und Erörterungen der Herren Michaelis und Pechstein nicht geeignet sind, die von uns entwickelte Auffassung der Katalasewirkung als einer Adsorptionskatalyse zu erschüttern. Alle von ihnen herangezogenen Punkte sind an verschiedenen Stellen unserer Arbeiten ausführlich erörtert; wir möchten annehmen, daß eine genauere Durchsicht derselben seitens der Herren Verfasser die jetzige Diskussion überflüssig gemacht haben würde.

Was endlich die theoretischen Ansichten und die Versuche der Herren Michaelis und Pechstein über Beziehungen

¹⁾ Es ist möglich, daß die von uns an reinen Fermentlösungen mit Sicherheit festgestellte Verschiebung des Alkalitätsoptimums mit der Temperatur aus ähnlichen Gründen von Michaelis und Pechstein nicht gefunden wurde.

zwischen den Eigenschaften des von ihnen untersuchten Organpreßsaftes und seinem elektrischen Verhalten anlangt, so möchten wir mit Bezugnahme auf die Untersuchungen von Pauli¹⁾ doch einige Zweifel daran hegen, ob der von den Verf. festgestellte isoelektrische Punkt wirklich als derjenige der reinen Katalase angesehen werden darf. Denn, wie die Verfasser selbst an anderer Stelle zugeben, enthält das Untersuchungsmaterial noch andere Eiweißkörper, wahrscheinlich amphoterer Reaktion. Doch da wir hierüber keine Versuche angestellt haben, möchten wir die Frage nur zur Diskussion stellen.

Bedenklich scheint uns der Versuch der Herren Michaelis und Pechstein, die Gesetze der nur für homogene Systeme gültigen chemischen Gleichgewichtslehre auf Katalaselösungen anzuwenden, die sich in jeder Hinsicht (Temperaturkoeffizient der Reaktionsgeschwindigkeit, Dialyse, Analogien mit dem suspensoiden Platinsol, Neutralsalzwirkung, ultramikroskopisches Bild) wie ein echtes Kolloid verhalten. So wünschenswert es auch ist, das Verhalten der Katalase etwa gegenüber Wasserstoffionen und Neutralsalzen durch zahlenmäßige Beziehungen festzulegen, so können wir doch vorläufig mit dem Begriff einer Dissoziationskonstanten eines Kolloids, wie es die Katalase ist, keine bestimmte Vorstellung verknüpfen und haben daher bei unseren Versuchen, die Wirkung von Säure und Alkali auf Katalase zu erklären (vgl. 3. Mitteilung, S. 494 ff.) die Aufstellung solcher zahlenmäßigen Beziehungen unterlassen. Zu beachten ist folgendes: Nach allem, was wir über die Kinetik der fermentativen Hydroperoxydzersetzung wissen, ist die gemessene Reaktion, die uns ein Maß für die Aktivität des Fermentes gibt, ein Diffusionsvorgang. Alle Änderungen der Aktivität, die wir durch Messung der Reaktionsgeschwindigkeit feststellen, werden daher auf Änderungen in der Diffusionsgeschwindigkeit beruhen und beziehen sich als solche auf ein heterogenes System.

¹⁾ Diese Zeitschr. 27, 296, 1910.

Phytochemische Reduktionen. I.

Umwandlung der Nitrogruppe in die Aminogruppe.

Von

Carl Neuberg und Ernst Welde.

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

Die Assimilation des Nitrat- und Nitritstickstoffs ist ein Vorgang, der untrennbar mit dem Wachstum und dem Bestand der Pflanzenwelt auf Erden verknüpft ist.

Vornehmlich in zweierlei Form steht der Stickstoff den Vegetabilien zur Verfügung: als anorganische Nitro- und Amino-Verbindung. Es läßt sich nicht prinzipiell sagen, welche der beiden Stickstoffformen in agrikulturchemischer Hinsicht die wichtigere ist, da einerseits durch die Tätigkeit der nitrifizierenden Bakterien Ammoniakstickstoff im Erdboden in Stickoxydabkömmlinge umgewandelt wird, und andererseits sowohl Ammoniumsalze als Nitrate und Nitrite von der Pflanze aufgenommen werden.

Völlig unbekannt ist, zu welchem Zeitpunkt und in welcher Form der anorganische Stickstoff in die organische Materie eintritt. Wir kennen lediglich das einfache Ausgangsmaterial und auf der anderen Seite jene wunderbare Fülle organischer Stickstoffverbindungen, die uns in den Phytoproteinen, den Pflanzenbasen und Alkaloiden entgegentritt.

Zahlreiche Hypothesen, die eine Überbrückung dieser Kluft anzubahnen versuchen, sind von Chemikern und Biologen in den letzten Dezennien aufgestellt worden, von denen nur die Namen von Berthelot, Schönbein, Pflüger, O. Loew, V. Meyer, Bach, Franzen, Baudisch und Loeb genannt sein mögen. Die Anschauungen der genannten Autoren stützen sich zum Teil

auf rein chemische Vorgänge, teils basieren sie auf bemerkenswerten Erfahrungen, die beim Studium der elektrischen und lichtchemischen Reaktionen gemacht worden sind.

Über die Grenzen der Hypothese ist man jedoch auf diesem Gebiete nicht herausgelangt. Insbesondere mangelt es, soweit unsere Kenntnis reicht, an experimentellen Unterlagen über das Verhalten einfacher Stickstoffverbindungen im pflanzlichen Organismus, die geeignet wären, über die Umwandlung zugeführten stickstoffhaltigen Materials eindeutigen Aufschluß zu gewähren. Der Grund für das Fehlen dieser Fundamentalversuche dürfte in der Schwierigkeit der Versuchsanordnung bei der Mehrzahl der Vegetabilien gelegen sein. Erfahrungen nun, die wir über die chemischen Leistungen der Hefezellen zu sammeln Gelegenheit hatten, waren uns Veranlassung, dieses pflanzliche Objekt für das Studium der Stickstoffassimilation in der gedachten Richtung heranzuziehen.

Ein besonders charakteristischer Prozeß, den die Hefe zuwege bringt, ist die Reduktion der Aldehyd- zur Alkoholgruppe, ein Vorgang, der eine recht energische Reduktionsleistung darstellt. Dieses Verhalten ermutigte uns, auch die Reduktion der Nitrogruppe durch Hefe unter denselben Bedingungen zu versuchen, die wir bei der Umwandlung des Aldehydrestes in den Alkoholrest als die günstigsten erkannt hatten¹⁾.

Der denkbar einfachste Fall der Reaktion zwischen Salpetersäure und einer organischen Substanz ist die Bildung eines Nitroderivates.

Wir haben unsere phytochemischen Versuche mit dem Nitrobenzol begonnen, weil die möglichen Zwischenstufen der Reduktion hier ausnahmslos bekannt sind, ein Umstand, der uns in methodischer Hinsicht für Arbeiten auf diesem Gebiete von besonderer Wichtigkeit zu sein scheint.

Gärende Hefe ist nach unseren Versuchen imstande, zugesetztes Nitrobenzol in beträchtlichem Umfange zu reduzieren.

¹⁾ C. Neuberg und Joh. Kerb, *Zeitschr. f. Gärungsphysiol.* 1, 114, 1912. — C. Neuberg und H. Steenbock, *diese Zeitschr.* 52, 494, 1913; 59, 188, 1913. — K. Ohta, *diese Zeitschr.* 59, 183, 1914. — Hinzu kommen noch unveröffentlichte Erfahrungen über die Reduktion des *n*-Valeraldehyds, Benzaldehyds, Phenylacetaldehyds, Zimtaldehyds usw.

Damit ist zum erstenmal die phytochemische Umwandlung der Nitrogruppe zur Aminogruppe an einem durchsichtigen Beispiel experimentell durchgeführt worden.

Aus den folgenden Versuchsergebnissen geht hervor, daß diese Reaktion durchaus regelmäßig nachgewiesen werden kann. Ein Teil des zugesetzten Nitrobenzols bleibt unangegriffen und kann unverändert zurückgewonnen werden; von der verschwundenen Menge sind in unseren Versuchen bis 70% in Anilin übergeführt worden. Was aus dem Rest wird, vermögen wir vorläufig nicht zu sagen, da wir andere definierte Umwandlungsprodukte zunächst nicht isoliert haben.

Die Reduktion des Nitrobenzols zu Anilin haben wir bisher nur mit arbeitender Hefe hervorgebracht; wir werden weiter untersuchen, ob sie auch von lebender Hefe trennbar, d. h. als ein rein enzymatischer Prozeß zu verwirklichen ist. Übrigens werden kleine Mengen Anilin auch durch gekochte Hefe in Gegenwart von reduzierendem Zucker aus Nitrobenzol gebildet.

Schon heute haben wir Anhaltspunkte dafür, daß auch andere — aromatische wie aliphatische — Nitrokörper durch gärende Hefe in gleicher Weise zu Aminoderivaten reduziert werden. Weiter beabsichtigen wir, mit unserer Versuchstechnik die phytochemische Reduktion der verschiedenen anderen Stickstoff-Sauerstoffstufen (Nitroso-, Hydroxylamin-, Azoxy-, Azo-, Hydrazo- usw. Gruppen) bei aromatischen wie aliphatischen Substanzen zu studieren, in der Hoffnung, hierdurch eine Reihe von experimentellen Beiträgen zur Frage der Stickstoffassimilation bei Pflanzen zu erbringen.

Experimenteller Teil.

I.

In zwei 5 l-Flaschen wurden je 250 g Rohrzucker in 2500 ccm Leitungswasser gelöst, mit je 250 g obergäriger Hefe (Rasse XII des Instituts f. Gärungsgewerbe zu Berlin) versetzt. Sobald die Gärung lebhaft geworden war, wurden in jede Flasche 5 ccm frisch destilliertes Nitrobenzol eingetropfelt. Der Zusatz des Nitrobenzols hat nur eine mäßige Hemmung der Gärung zur Folge; die Gasentwicklung bleibt bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank im Gange. Namentlich im Anfang wird durch

häufiges Umschütteln für eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Nitrobenzols in der gärenden Flüssigkeit gesorgt. In dem Maße, wie die durch die Gärung erzeugte Alkoholmenge zunimmt, verschwinden die zunächst am Boden des Gefäßes und im Schaum befindlichen Nitrobenzoltropfen. Nach 3 tägigem Stehen bei Zimmertemperatur und darauffolgender 2 tägiger Aufbewahrung im Brutschrank wurde der Inhalt jeder Flasche in ein 12 l fassendes Destillationsgefäß aus Kupfer (unter Nachspülung mit etwa 250 ccm Wasser) übergeführt. Die stets schwach sauer reagierende Flüssigkeit wurde nun mit Kalilauge¹⁾ bis zur bleibenden Reaktion auf Phenolphthalein alkalisch gemacht und im Dampfstrom destilliert. Hierbei wird, um das sonst sehr lebhaftes Schäumen der hefehaltigen Flüssigkeit zu vermeiden, das Destillationsgefäß anfangs nicht direkt erhitzt, sondern lediglich durch den Dampf zum Sieden gebracht. Nach etwa $\frac{1}{4}$ Stunde ist die Flüssigkeit dann so weit beruhigt, daß man die Destillation durch direktes Erhitzen beschleunigen kann. Das Destillat geht zunächst klar über, da der durch die Gärung entstandene Alkohol Nitrobenzol wie Anilin in Lösung hält. Später trübt sich die übergende Flüssigkeit milchig, um zum Schluß wieder ein völlig wasserklares Destillat zu liefern. Wir haben jedoch die Destillation noch so lange fortgesetzt, bis die übergende Flüssigkeit keine Spur mehr nach Nitrobenzol roch. Das Destillat betrug etwa $1\frac{1}{2}$ l; es reagierte deutlich alkalisch, weniger wegen seines Gehalts an Anilin, als infolge übergegangenen Ammoniaks, das bei dieser Art der Verarbeitung stets aus der Leibessubstanz der Hefe hervorgeht.

Zur weiteren Verarbeitung wurde das Destillat bis zur deutlichen Reaktion auf Kongo mit Schwefelsäure angesäuert und das Nitrobenzol mit Wasserdämpfen abgetrieben. Diese Reaktion, die rasch und ohne Schäumen verläuft, entfernt zugleich auch den Alkohol. Es ist wesentlich, die Destillation auch hierbei bis zum völligen Verschwinden des Nitrobenzolgeruchs fortzusetzen, wobei wieder etwa $1\frac{1}{2}$ l Destillat erhalten werden.

Der schwefelsaure Destillationsrückstand wird nunmehr alkalisch gemacht und weiter mit Wasserdampf destilliert, bis

¹⁾ 50 ccm 33%ige Kalilauge, die der Flüssigkeit einen Gehalt von 0,66% KOH erteilen, fanden wir ausreichend.

nochmals $1\frac{1}{2}$ l Destillat übergegangen sind. Die Flüssigkeit geht anfangs milchig über, wird aber später wieder klar; sie riecht basisch und reagiert alkalisch. Sie wird nunmehr erschöpfend ausgeäthert und der ätherische Auszug ca. 20 Stunden über frischgeglühtem Kaliumcarbonat getrocknet. Der Äther wird dann vorsichtig am Birektifikator abdestilliert, der braun gefärbte Rückstand in ca. 30 ccm absolutem Äther aufgenommen und nochmals über Kaliumcarbonat¹⁾ scharf getrocknet, da es nach unseren Erfahrungen schwierig ist, größere Äthermengen mit nur einmaliger Trocknung ganz wasserfrei zu erhalten.

Nun wird der Äther unter sorgfältigem Nachspülen durch einen Tropftrichter nach und nach in ein kleines Fraktionierkölbchen gebracht und gleichzeitig abdestilliert. Nachdem aller Äther übergegangen ist, steigt das Thermometer bei weiterem Erhitzen rasch bis gegen 180° , wobei nur wenige Tropfen einer farblosen, widerlich mercaptanähnlich riechenden Flüssigkeit übergehen¹⁾. Bei 181 bis 184° gehen 3,8 g einer fast konstant siedenden gelblichen Flüssigkeit über, und nur ein geringer dunkler Zersetzungsrückstand bleibt im Kolben zurück. Die Fraktion vom Siedepunkt 181 bis 184° zeigt alle Reaktionen von reinem Anilin: die Furfurol-, die Diazo- und die Chlorkalkprobe, Bildung des charakteristischen, in Alkohol schwer löslichen Sulfats und des Chloroplatinats.

Schon das einmal fraktionierte Produkt zeigte, wie der Siedepunkt erwarten ließ, bei der Analyse die Zusammensetzung von fast reinem Anilin.

0,1653 g Subst.: 21,3 ccm N (17° , 751 mm),
 0,1501 g " : 0,4225 g CO₂, 0,0996 g H₂O.

C₆H₇N. Ber.: N = 15,05; C = 77,42; H = 7,53 %.
 Gef.: N = 14,78; C = 76,81; H = 7,38 %.

¹⁾ Durch diese Art der Verarbeitung wird in einfacher Weise auch das Ammoniak entfernt: es entweicht wohl größtenteils bereits mit den Ätherdämpfen, jedenfalls weit unter dem Siedepunkte des Anilins. Wir bemerken noch, daß erst nach Entfernung des Ammoniaks die Chlorkalkreaktion deutlich positiv ausfällt. Mit dem Rohdestillat der Hefenansätze, das wässriges Anilin neben Ammoniak enthält, ist erst nach vorsichtiger Neutralisation mit Essigsäure eine Violettfärbung zu erhalten, die nicht immer die ganz typische Farbnuance aufweist.

Die Verunreinigungen scheinen in Spuren noch anhaftenden Nitrobenzols zu bestehen; denn beim Aufnehmen in verdünnter Mineralsäure bleiben winzige Öltröpfchen ungelöst. Zu einem völlig analysenreinen Produkt gelangt man, indem man das erhaltene Anilin in dünner Schwefelsäure löst, die Verunreinigungen ausäthert, die wässrige Lösung dann alkalisch macht und das Anilin mit Äther aufnimmt. Nach sorgfältigem Trocknen über entwässertem Glaubersalz und darauffolgendem Abdestillieren des Äthers erhält man restlos bei $182,5^{\circ}$ übergehendes, fast farbloses Anilin. (Analyse s. unten.)

Der Rest des Anilins wurde in das Sulfat verwandelt. Dieses wurde mit Alkohol ausgewaschen und aus heißem Wasser umkrystallisiert.

Analyse des aus Wasser umkrystallisierten Sulfats:

0,5437 g Subst. gaben 0,4477 g BaSO_4 (= 0,0615 g S).

$(\text{C}_6\text{H}_5\text{.NH}_2)_2\text{H}_2\text{SO}_4$. Ber.: S = 11,26%; gef.: S = 11,31%.

II.

500 g Rohrzucker, in 5 l Leitungswasser gelöst, werden mit 500 g Hefe versetzt und zu der gärenden Masse 15 ccm (= 17,5 g) Nitrobenzol gegeben. Nach 5 tägigem Stehenlassen bei Zimmer-temperatur und im Brutschrank wird die Flüssigkeit genau wie bei Versuch 1 behandelt. Nur wurde hierbei auch das saure Destillat ausgeäthert und so das unverändert gebliebene Nitrobenzol wiedergewonnen, durch Destillation gereinigt und gewogen¹⁾.

Die Resultate sind folgende:

Aus dem sauren Destillat zurückerhalten: 10,0 g Nitrobenzol.

„ „ alkal. „ erhalten: 3,9 g Anilin
v.Siedep. 181 bis 184° .

Im ganzen waren also $17,5 - 10,0 = 7,5$ g Nitrobenzol verschwunden, die theoretisch 5,7 g Anilin bei einer vollkommenen Reduktion hätten ergeben können.

Isoliert wurden 3,9 g Anilin gleich rund 70% der berechneten Menge.

0,1511 g Subst.: 20,1 ccm N (18° , 750 mm).

0,1206 g Subst.: 0,3419 g CO_2 , 0,0825 g H_2O .

$\text{C}_6\text{H}_7\text{N}$. Ber.: N = 15,05; C = 77,42; H = 7,53%.

Gef.: N = 15,16; C = 77,31; H = 7,60%.

¹⁾ Natürlich ist die Bestimmung des Nitrobenzols nicht ganz quantitativ.

III.

Bei dem Interesse, das die phytochemische Bildung des Anilins aus Nitrobenzol wohl beanspruchen darf, haben wir alle Operationen bis in kleine Einzelheiten genau beschrieben und den Befund durch die verschiedensten Analysen gesichert. Angesichts der Bedeutung der ganzen Frage haben wir die Ergebnisse auch noch nach anderer Richtung hin kontrolliert und insbesondere Versuche darüber angestellt, ob etwa zufällig in der Apparatur gelegene reduzierende Agenzien irgendwie mitgewirkt haben könnten.

Da die Verarbeitung der großen schäumenden Massen am bequemsten in Metallgefäßen geschieht, wobei die Destillation aus einem Kupferkessel bei alkalischer Reaktion erfolgt, haben wir einen vollständigen Versuch lediglich in Jenenser Glaskolben durchgeführt. Das Ergebnis war das gleiche. Es entstand dieselbe Menge Anilin. Die kupferne Destillierblase hat, wie zu erwarten war, keinen Anteil an dem Reduktionsvorgang.

IV.

Weiter schien uns von Interesse festzustellen, ob das organische Material, wie es in dem Gärgut gegeben ist, d. h. Hefezellen plus Zucker, bei Gegenwart von Alkali reduzierend wirkt.

a) Um den natürlichen Verhältnissen in den Gärungsansätzen möglichst nahe zu kommen, haben wir zunächst eine Invertzuckerlösung mit abgetöteter Hefe und Nitrobenzol erst 2 Tage bei Zimmertemperatur, dann 3 Tage im Brutschrank digeriert und dann nach Beigabe von Alkali destilliert. Das Resultat gibt nachstehend beschriebener Versuch wieder:

500 g Rohrzucker werden in 2500 ccm Leitungswasser mit 100 ccm $\frac{n}{1}$ -Schwefelsäure 1 Stunde lang zur Inversion auf dem Wasserbade erhitzt, dann 100 ccm $\frac{1}{1}$ -Natronlauge zugegeben und die heiße Lösung zu einer im Dampftopf sterilisierten Abkochung von 500 g Hefe XII in 2300 g Leitungswasser gegeben. Nach dem Abkühlen werden 17,5 g Nitrobenzol zugesetzt und das Gemisch unter Umschütteln 2 Tage bei Zimmertemperatur und 3 Tage im Brutschrank sich selbst überlassen.

Die Verarbeitung erfolgte genau wie bei den vorher beschriebenen Versuchen.

Erhalten wurden:

aus dem sauren Destillat: 13,5 g unverändertes Nitrobenzol,

aus dem alkalischen Destillat: 0,5 g Anilin (roh, Siedep. 181 bis 183°).

Nicht wiedergefunden wurden also im ganzen 4,0 g Nitrobenzol, von denen aber nur 0,5 g als Rohanilin erschienen.

β) Bei einem zweiten Ansatz wurde der Zucker durch eine ungefähr äquivalente Menge Alkohol ersetzt und die Quantität des Nitrobenzols verdoppelt.

500 g Hefe XII, 5000 ccm Leitungswasser, 250 ccm 98%iger Alkohol und 17,5 g Nitrobenzol wurden 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann nach Zusatz von weiteren 17,5 g Nitrobenzol 4 Tage im Brutschrank digeriert. Die Verarbeitung nach der beschriebenen Methode lieferte 32 g Nitrobenzol zurück und 0,5 g Rohanilin (Siedep. 180 bis 184°).

γ) Eine dritte Kontrolle bestand in der Verwendung einer ausgegorenen Zuckerlösung.

Das Gemenge von 5000 ccm Leitungswasser, 500 g Rohrzucker und 500 g Hefe XII wurde 3 Tage bis zum Aufhören jeder Gasentwicklung vergoren. Dann wurden 17,5 g Nitrobenzol hinzugesetzt und 4 Tage im Brutschrank belassen. Die Aufarbeitung ergab 13,5 g Nitrobenzol zurück und nur 0,2 g Anilin vom Siedep. 181 bis 184°.

Ob kleine Mengen Schwefelalkali¹⁾ bei der Destillation mit Natronlauge aus dem Hefeeiweiß gebildet werden oder welches reduzierende Agens sonst hier sich geltend macht, ist nicht näher untersucht worden.

Durch die lebende und arbeitende Hefe wird eine so erheblich höhere Ausbeute erzielt, daß an der Auffassung des ganzen Vorgangs als einer Vitalleistung der Hefe nicht gezweifelt werden kann. (Natürlich sind rein enzymatische Prozesse nicht ausgeschlossen, worüber besondere Versuche angestellt werden sollen.)

Die reichliche Bildung des Anilins durch gärende Hefe haben wir in keinem Falle vermißt. Von der Wiedergabe der übrigen Versuche kann abgesehen werden; die erhaltenen Mengen bewegten sich stets zwischen 35 und 70% der theoretisch möglichen Ausbeute, berechnet auf das verschwundene Quantum Nitrobenzol.

¹⁾ Hierauf weist vielleicht die Bildung eines mercaptanähnlichen Begleiters (s. S. 476) hin.

Über den Einfluß ultravioletten Lichtes auf halogensauerstoffsäure Alkalien.

Von
W. Oertel.

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

(Eingegangen am 9. Februar 1914.)

Das genauere Studium der zahlreichen Lichtreaktionen, die in den letzten Jahrzehnten aufgefunden worden sind, hat ergeben, daß die weitaus größte Zahl von ihnen recht komplizierter Natur ist. Was wir als Reaktionsprodukte qualitativ und quantitativ beobachten, ist fast immer das Resultat mehrerer gleichzeitig oder nacheinander erfolgender Licht- und Dunkelreaktionen, wobei oft noch Katalysatoren im Spiele sind. Es sei nur an die Photooxydation und Photosubstitution durch die Halogene erinnert oder an die umkehrbaren Lichtreaktionen, an die Zersetzung und Neubildung von Ozon, Wasserstoffsuperoxyd, Phosgen, von Stickoxyden usw. im Licht. Besondere Aufmerksamkeit dürften daher solche lichtchemischen Reaktionen beanspruchen, die ohne störende Nebenreaktionen eindeutig und quantitativ verlaufen und die sich bequem messend verfolgen lassen. Derartige Reaktionen scheinen die Zersetzungen der Alkalisalze der sauerstoffreichen Halogensäuren zu sein, die nach den weiter unten anzuführenden Versuchen durch ultraviolettes Licht quantitativ in Alkalihalogenid und Sauerstoff zerlegt werden.

Über die Zersetzung der genannten Salze durch ultraviolettes Licht findet sich in der Literatur nur eine Angabe in einer Arbeit von W. H. Roß¹⁾. Hierin stellt Roß fest, daß wässrige Lösungen von Alkalichloraten und Bromaten, im Sonnen-

¹⁾ W. H. Roß, Journ. of the American chemical Society 28, 786, 1906.

licht völlig beständig, durch ultraviolette Strahlen angegriffen werden unter Bildung von Chlorid bzw. Bromid. Indessen war die Versuchsanordnung des Verfassers, dem anscheinend weder eine genügend starke, an ultravioletten Strahlen reiche Lichtquelle noch geeignete, für ultraviolettes Licht durchlässige Gefäße zur Verfügung standen, so wenig rationell, daß die erzielten Wirkungen äußerst klein waren. Er belichtete je 3 ccm der Chlorat- oder Bromatlösungen je 10 Minuten lang in einem offenen Schiffchen unter einem zwischen Aluminiumelektroden übergehenden oszillierenden Induktionsfunken und titrierte dann mit $\frac{n}{200}$ -Silbernitratlösung. So findet er für die aus je 3 ccm Chloratlösung verschiedener Konzentration ($\frac{n}{2}$ bis $\frac{n}{50}$) gebildete Chloridmenge übereinstimmend zu 0,8 ccm $\frac{n}{200}$ -Silbernitratlösung, bei den analogen Versuchen mit Bromaten gar nur zu 0,25 ccm $\frac{n}{200}$ -Silberlösung. Bedenkt man ferner, daß bei der Versuchsanordnung des Verfassers eine Mitwirkung von Stickoxyden, Ozon oder H_2O_2 nicht ausgeschlossen ist, so kann man den quantitativen Beobachtungen kaum Wert zuerkennen. Vor allem aber geht aus den Versuchen von Roß nicht hervor, ob sich die beobachtete Lichtwirkung durch längeres und kräftigeres Belichten wesentlich vermehren läßt oder ob es sich nur um eine geringfügige Zersetzung handelt, die sich auch durch langes Bestrahlen nicht erheblich vermehren läßt, wie dies z. B. bei den Alkalijodiden der Fall ist. Auch scheint Roß eine Gasentwicklung nicht beobachtet zu haben, was allerdings unter seinen Versuchsbedingungen kaum möglich war.

Die von mir angestellten Versuche hatten vornehmlich den Zweck, festzustellen, ob die Zersetzung der genannten Salze einschließlich der von Roß nicht untersuchten Jodate, Perjodate, Bijodate und Perchlorate bei energischer Belichtung sich weitgehend steigern läßt. Ferner wurden einige vergleichende Versuche zwischen den analogen Salzen der 3 Halogene und zwischen den Na- und K-Salzen derselben Säuren angestellt, die von den Zersetzungsgeschwindigkeiten z. T. ein ganz anderes Bild geben als die Resultate von Roß. Auf genaue Messungen ist vorläufig verzichtet worden, da die Bedingungen für solche nicht leicht zu erfüllen sind; insbesondere scheint es überaus schwer zu sein, die Konzentration und Homogenität der Lösungen während längerer Belichtungszeiten konstant zu halten.

Die von mir benutzte Versuchsanordnung war recht einfach. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberquarzlampe von Heraeus (3000 Kerzen Lichtstärke). Die zu untersuchenden Lösungen wurden in Quarzgefäßen von verschiedener Gestalt (Kölbchen, Reagensröhrchen, Gärröhrchen) im lichten Abstand von 5 bis 8 cm vom Quarzrohr der Lampe belichtet.

A. Versuche mit Chloraten und Perchloraten.

Ein langhalsiges Quarzkölbchen von 70 ccm Kolbeninhalt wurde bis zum Rande mit einer 5%igen Lösung reinsten Kaliumchlorats gefüllt, mit dem Finger verschlossen und die Mündung des umgestülpten Kölbchens unter den Flüssigkeitsspiegel einer in einem Porzellanschälchen befindlichen Kaliumchloratlösung derselben Konzentration gebracht. Das Ganze wurde darauf, in einem Stativ befestigt, eine Nacht lang an der Quarzlampe belichtet, so daß der Abstand zwischen dem Rohr der Lampe und der Rundung des Kölbchens 6 cm betrug. Es zeigte sich, daß 5 Minuten nach Zündung der Lampe Gasbläschen in der Flüssigkeit emporzusteigen beginnen. Da die Gasentwicklung andauerte, konnte sie nicht etwa durch Entweichen gelöster Luft bedingt sein. Am nächsten Morgen, nach 12 stündigem Belichten, hatten sich im Kolben etwa 20 ccm Gas angesammelt. Das Gas entzündete einen glimmenden Holzspan zu heller Flamme, kann also nur Sauerstoff sein. Die Lösung reagierte neutral und gab mit Silbernitratlösung eine kräftige Fällung von weißem, käsigem Chlorsilber, löslich in NH_3 , unlöslich in HNO_3 (AgClO_3 ist wasserlöslich!).

Das gleiche Verhalten zeigte eine in derselben Weise belichtete Natriumchloratlösung.

In gläsernen Gefäßen (Gärröhrchen) zeigten Lösungen beider Salze, 12 Stunden lang belichtet, keine Spur von Veränderung; weder entwickelte sich aus den durch vorheriges Auskochen von gelöster Luft befreiten Lösungen Gas, noch zeigten die belichteten Lösungen auf Zusatz von AgNO_3 auch nur eine Trübung.

Man darf daher annehmen, daß Alkalichlorate in wässriger Lösung durch die für Glas undurchlässigen ultravioletten Strahlen weitgehend in Chlorid und Sauerstoff zerlegt werden.

Um festzustellen, ob die Zersetzung bei genügend langer Belichtung quantitativ wird, wurden Chloratlösungen verschie-

dener Konzentration in Reagensgläsern aus Quarz im Abstand von 6 cm vom senkrecht gestellten Quarzrohr der Lampe belichtet. Um ein Eindunsten der durch die Wärmestrahlen der Lampe ständig auf etwa 70° erwärmten Lösungen zu verhindern, waren den Reagensröhrchen kleine Rückflußkühler aufgesetzt. Von Zeit zu Zeit wurde $\frac{1}{2}$ ccm Lösung entnommen und auf noch vorhandene Chlorsäure geprüft. Dies geschah in der Weise, daß die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure aufgeköcht, abgekühlt und darauf mit Jodkaliumstärkelösung versetzt wurde. Es lassen sich so noch Spuren von Chlorsäure nachweisen. Es zeigte sich, daß $\frac{n}{100}$ -Lösungen nach 15 Stunden quantitativ zerlegt sind. Bei höherer Konzentration erforderte die Zersetzung mehrere Tage.

Auch die trockenen Salze werden beim Belichten unter der Quarzlampe gespalten. Streut man auf ein Uhrglas feingepulvertes Chlorat und belichtet mehrere Stunden, so findet eine lebhafte Zerstäubung an der Oberfläche statt. Das belichtete Salz gibt, in Wasser gelöst, mit Silberlösung eine käsige Fällung von Chlorsilber. Indessen bleibt die Zersetzung auf die oberste Schicht beschränkt. Die hierzu verwendeten Salze waren zuvor durch 12 stündiges Erhitzen im Trockenschrank auf 110° völlig von Feuchtigkeit befreit worden; eine Zersetzung tritt während des Trocknens nicht ein.

Anders als die Chlorate verhalten sich die Perchlorate. Bekanntlich sind die Salze der Überchlorsäure selbst gegen sehr kräftige Reduktionsmittel ziemlich beständig; auch geben sie ihren Sauerstoff beim Erhitzen erst bei viel höherer Temperatur ab als die Chlorate. Eine ähnliche Beständigkeit zeigen sie auch unter dem Einfluß ultravioletten Lichtes. Belichtete man 1% ige Lösungen von Kalium- oder Natriumperchlorat in der oben beschriebenen Weise im umgestülpten Quarzkölbchen von 70 ccm Inhalt, so war von einer lebhaften Gasentwicklung nichts zu merken; erst nach 24 stündigem Belichten hatte sich eine geringe Gasmenge, etwa 2 ccm, angesammelt, die sich als Sauerstoff zu erkennen gab. Die Lösung gibt alsdann auf Zusatz von Silberlösung eine schwache Trübung von Chlorsilber (AgClO_4 ist wasserlöslich!).

Auch die trockenen, gepulverten Perchlorate werden nur sehr wenig vom ultravioletten Licht angegriffen. Nach 11 stün-

diger Belichtung gaben die Salze, in Wasser gelöst, nur eine schwache Fällung mit Silbernitratlösung. Die Zersetzung war auch hier von einer Zerstäubung an der Oberfläche begleitet.

B. Versuche mit Bromaten.

Eine 5%ige Lösung von Kaliumbromat¹⁾ wurde im umgestülpten Quarzkölbchen eine Nacht hindurch belichtet. 1 Minute nach Zündung der Lampe begann bereits eine lebhafte Gasentwicklung. Am nächsten Morgen, nach 12 Stunden, war der ganze Kolben, etwa 70 ccm, mit Sauerstoff erfüllt. Die Lösung reagierte neutral, roch ganz schwach nach Brom und war eine Spur gelblich gefärbt. Versetzte man sie tropfenweise mit Silberlösung, so fiel zuerst gelblich-weißes AgBr aus, später reinweißes AgBrO₃, das beim Kochen mit verd. HNO₃ wieder in Lösung ging und eine beträchtliche Menge AgBr zurückließ. Mit Jodkaliumstärkelösung gab die belichtete Lösung schon in neutralem Zustand eine Blaufärbung infolge ihres geringen Gehaltes an freiem Brom. Kocht man vorher eine Zeitlang, kühlt ab und setzt dann Jodkaliumstärkelösung hinzu, so tritt keine Blaufärbung mehr auf. Säuert man dagegen die belichtete Lösung mit verd. H₂SO₄ an, so wird sie sofort dunkelbraun, indem sich bedeutende Brommengen entwickeln. Dies beweist ebenfalls auf Gegenwart von Bromid neben Bromat.

Das gleiche Verhalten zeigen Lösungen von Natriumbromat.

In gläsernen Gefäßen werden die Lösungen kaum verändert.

Man darf daher behaupten, daß auch die Alkalibromate in wässriger Lösung durch ultraviolettes Licht weitgehend in Bromid und Sauerstoff zerlegt werden. Das gebildete Bromid wird in geringer Menge weiter zersetzt.

Bei längerem Belichten wird auch bei den Bromaten die Zersetzung quantitativ. Es zeigte sich, daß die Bromate weit schneller zersetzt werden als die Chlorate. Daher gelang es, eine $\frac{1}{10}$ -KBrO₃-Lösung im Quarzreagensröhrchen mit auf-

¹⁾ Das verwendete Kaliumbromat war praktisch rein. Zur Prüfung wurden 0,1165 g gelöst, mit reichlich Jodkalium versetzt, angesäuert und mit $\frac{1}{10}$ -Thiosulfat die ausgeschiedene Jodmenge titriert. Hieraus ergab sich ein Bromgehalt des verwendeten Kaliumbromats an 0,0555 g Br, während die berechnete Menge 0,0557 g beträgt.

gesetztem Rückflußkühler bereits in 18 Stunden quantitativ zu zerlegen. Das Ende der Zersetzung wurde wieder am Verschwinden der Jodkaliumstärkereaktion erkannt. Hierbei ist zu beachten, daß vor dem Zusatz von Säure und Jodkaliumstärkelösung die kleine Menge freien Broms durch Kochen entfernt werden muß.

In einem besonderen Falle wurde auch die Menge des aus der Zersetzung resultierenden Bromids titrimetrisch bestimmt. Von einer annähernd $\frac{1}{10}$ -KBrO₃-Lösung, die in 1 ccm genau 0,0079 g Br enthielt, wurden genau 5 ccm in einem Quarzreagensröhrchen mit aufgesetztem Rückflußkühler 18 Stunden lang belichtet, die Lösung darauf quantitativ in ein Meßkölbchen von 50 ccm Inhalt überführt und bis zur Marke aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 10 ccm abpipettiert und auf Bromsäure geprüft, um sich von der Vollständigkeit der Zersetzung zu überzeugen. Der Rest, der also 4 ccm der belichteten Lösung enthielt, wurde mit $\frac{1}{10}$ -Silberlösung titriert. Gebraucht wurden 3,84 ccm, entsprechend 0,0307 g Br. Da 4 ccm der unbelichteten Lösung 0,0316 g Br enthielten, sind 97,2% des ursprünglich als Bromat enthaltenen Broms als Bromid in der belichteten Lösung wiedergefunden worden. Der fehlende Rest ist wohl als freies Brom während des Belichtens entwichen.

Belichtet man Kalium- und Natriumbromat in trockenem, gepulvertem Zustande mehrere Stunden an der Quarzlampe, so werden sie ebenfalls an der Oberfläche zersetzt. Merkwürdigerweise wird KBrO₃ bedeutend stärker gespalten als NaBrO₃. Das Kaliumsalz sieht nach 12stündigem Belichten noch rein weiß aus und zeigt Zerstäubung an der Oberfläche. Die Lösung des belichteten Salzes färbt sich auf Zusatz von Säure durch Bromausscheidung kräftig braun und gibt mit den ersten Tropfen Silberlösung eine deutliche Fällung von gelblich-weißem AgBr. Das Natriumsalz sieht nach dem Belichten schwach gelb aus und ist kaum zerstäubt. Seine Lösung in Wasser gibt beim Ansäuern nur eine schwache Gelbfärbung durch Bromausscheidung; die Fällung mit Silber ist fast rein weiß und enthält sehr wenig AgBr. Die hierzu verwendeten Salze waren wieder durch 12stündiges Trocknen bei 110° von anhaftender Feuchtigkeit befreit worden.

C. Versuche mit Jodaten, Bi- und Perjodaten.

Es wurde zunächst wieder eine 5^o/_oige Kaliumjodat-lösung¹⁾ im umgedrehten Quarzkölbchen über Nacht an der Quarzlampe belichtet. 3 Minuten nach Zündung der Lampe begannen bereits Gasbläschen in der Flüssigkeit emporzusteigen, gleichzeitig bräunte sich die Lösung. Nach 12stündigem Belichten hatten sich etwa 35 ccm Sauerstoff angesammelt. Die Flüssigkeit sah kräftig braun aus, doch nicht dunkler, als sie bereits $\frac{1}{3}$ Stunde nach Entzündung der Lampe gewesen war. Sie reagierte neutral, roch nach Jod und färbte sich auf Zusatz von Stärkelösung blau. Entfernte man durch kurzes Kochen das in Lösung befindliche freie Jod und säuerte darauf an, so trat eine sehr kräftige Jodausscheidung ein. Dies weist auf Gegenwart von Jodid neben Jodat hin. Versetzte man die belichtete Lösung nach Wegkochen des freien Jods tropfenweise mit Silbernitratlösung, so fiel zunächst gelbes AgJ, später rein weißes AgJO₃, das sich auf Zusatz von NH₃ leicht löste und eine beträchtliche Menge AgJ zurückließ. Das gleiche Verhalten zeigte eine 5^o/_oige Natriumjodatlösung nach 12stündigem Belichten. In gläsernen Gefäßen fand eine Gasentwicklung kaum statt. Mithin werden auch Jodate in wässriger Lösung durch ultraviolette Strahlen weitgehend in Jodid und Sauerstoff zerlegt. Das neugebildete Jodid wird in geringer Menge weiter zersetzt unter Ausscheidung von Jod; doch erreicht die Menge dieses freien Jods selbst bei tagelangem Belichten nie 1^o/_o der Gesamtmenge, was durch wiederholte titrimetrische Bestimmungen festgestellt wurde und mit den Erfahrungen anderer Autoren beim Belichten von Jodiden übereinstimmt²⁾.

¹⁾ Das benutzte Kaliumjodat wurde auf seine Reinheit geprüft und als praktisch rein befunden. 0,1238 g wurden in Wasser gelöst, mit überschüssigem KJ versetzt und mit H₂SO₄ angesäuert. Zur Titration des ausgeschiedenen Jods wurden 34,62 ccm $\frac{2}{10}$ -Thiosulfatlösung gebraucht, die einem KJO₃-Gehalt von 0,1236 g entsprechen.

²⁾ Ich möchte bei dieser Gelegenheit erwähnen, daß auch quantitative Untersuchungen über die Zersetzung der Jodide von mir ausgeführt worden sind, deren Veröffentlichung ich indessen auf die in-zwischen in den „Mitteilungen aus dem Institut für Radiumforschung“ (Monatsh. f. Chem. **34**, 1209, 1913) erschienene ausführliche Arbeit von A. Kailan hin unterlassen habe, zumal meine Resultate mit denen Kailans gut übereinstimmen.

Auch bei den Jodaten läßt sich die Zersetzung im ultravioletten Lichte quantitativ durchführen. Da sie langsamer als die Bromate zersetzt werden, wurden zum Nachweis der quantitativen Zersetzungen wie bei den Chloraten $\frac{n}{100}$ -Lösungen verwendet. Sie wurden in Reagensröhrchen aus Quarz mit aufgesetztem Rückflußkühler in 6 cm Abstand von dem senkrecht gestellten Rohr der Lampe belichtet. Es zeigte sich, daß nach 20 stündiger Bestrahlung die Zersetzung vollständig war. Die Lösung gab alsdann nach Wegkochen des freien Jods beim Ansäuern und Zusatz von Stärkelösung keine Blaufärbung mehr. Auffällig war, daß die Zersetzung gegen Ende sich außerordentlich verlangsamte.

Ganz anders als die wässerigen Lösungen der Jodate verhalten sich die trockenen Salze. Bei 110° getrocknetes, jodidfreies Kalium- und Natriumjodat wurde auf Uhrgläsern eine Nacht lang unter der Quarzlampe belichtet. Die Salze färben sich hierbei gelb, das Na-Salz stärker als das K-Salz, zeigen aber keine Spur von Zerstäubung. In Wasser gelöst reagierten sie neutral und gaben mit Stärkelösung eine ganz schwache Blaufärbung, das Na-Salz etwas stärker als das K-Salz. Auf Zusatz von verd. H_2SO_4 wurde die Blaufärbung nicht stärker. Versetzte man die Lösungen der belichteten Salze tropfenweise mit Silberlösungen, so schied gleich der erste Tropfen rein weißes $AgJO_3$ aus, das sich auf Zusatz eines Tropfens verd. NH_3 sofort klar löste. Hieraus geht hervor, daß eine merkliche Zerlegung in Jodid und Sauerstoff beim Belichten der trockenen Jodate nicht stattfindet.

Über die Versuche mit Bijodaten und Perjodaten sei nur kurz berichtet. Da die Bijodate als molekulare Verbindungen von Jodat und Jodsäure zu betrachten sind und stark sauer reagieren, so sind außer K- und JO_3 -Ionen noch andere Ionen in Lösung, so daß die Verhältnisse hier komplizierter sind. Die Perjodate sind so wenig in Wasser löslich, daß sich nur $\frac{n}{100}$ -Lösungen untersuchen lassen. Es wurde festgestellt, daß auch die Bijodate und Perjodate beim Belichten an der Quarzlampe unter Sauerstoffentwicklung zersetzt werden. Die Zersetzung, deren Geschwindigkeit annähernd die gleiche ist wie bei den Jodaten, läßt sich bei $\frac{n}{100}$ -Lösungen ebenfalls quantitativ durchführen.

D. Vergleichende Versuche.

Die Zersetzungsgeschwindigkeit der Alkalihalogenate im ultravioletten Licht ist, wie oben bereits angedeutet, verschieden groß. Es interessieren vornehmlich drei Fragen: 1. Ist die Zersetzungsgeschwindigkeit abhängig von der Natur des Halogens? 2. Ist die Konzentration von Einfluß auf die Menge der in gleichen Zeiten gebildeten Zersetzungsprodukte? 3. Ist die Natur des Kations von Einfluß auf die Zersetzungsgeschwindigkeit?

Die folgenden vergleichenden Versuche wurden in der Weise vorgenommen, daß die zu kontrollierenden Lösungen in Quarz-gärröhrchen von gleichen Dimensionen (10 mm äußerer Durchmesser des langen Schenkels) gleichzeitig im gleichen Abstand von dem senkrecht gestellten Rohr der Lampe belichtet und dann die in der gleichen Zeit entwickelten Sauerstoffmengen verglichen wurden.

Es wurde zunächst der Einfluß des Halogens untersucht. $\frac{n}{10}$ -Lösungen von KClO_3 , KBrO_3 und KJO_3 wurden gleichzeitig bestrahlt. Nach 1 Stunde betrug die entwickelte Sauerstoffmenge nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur bei der KClO_3 -Lösung 0,05 ccm, bei der KBrO_3 -Lösung 1,4 ccm, bei der KJO_3 -Lösung 0,35 ccm. Die Bromatlösung entwickelte also in derselben Zeit 4 mal mehr Sauerstoff als die Jodatlösung und 28 mal mehr als die Chloratlösung. Bedenkt man, daß mit zunehmendem Sauerstoffvolumen mehr und mehr Flüssigkeit aus dem Röhrchen verdrängt und dadurch der Belichtung entzogen wird, so erscheint die Zersetzungsgeschwindigkeit der Bromate noch größer. Belichtet man statt $\frac{n}{10}$ -Lösungen solche von der Konzentration $\frac{n}{100}$, so ist der Unterschied der Zersetzungsgeschwindigkeiten kleiner. Bei 3 stündigem Belichten von $\frac{n}{100}$ -Lösungen der obigen drei Salze lieferte das Bromat 0,85 ccm, das Jodat 0,40 ccm, das Chlorat 0,10 ccm Gas. Jedenfalls ist ersichtlich, daß die Bromate schneller als die Jodate, diese wieder schneller als die Chlorate zersetzt werden. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den Resultaten von Roß, der bei 10 Minuten Belichtung am oszillierenden Induktionsfunken die Zersetzung der Chlorate größer fand als die der Bromate. Dieser Widerspruch ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß die Zeit, die zum Angehen der Reaktion notwendig ist, bei

den Versuchen von Roß infolge der geringen Lichtstärke seines Beleuchtungsapparates und der Kürze seiner Belichtungszeit sehr ins Gewicht fällt und zu unrichtigen Resultaten geführt hat. Es sei ferner noch besonders hingewiesen auf den Unterschied zwischen dem Verhalten der Chlorate und Bromate im ultravioletten Licht und ihrem Verhalten bei höherer Temperatur. Schmilzt man äquivalente Menge KClO_3 und KBr zusammen, so bildet sich quantitativ KCl und KBrO_3 , woraus sich ergibt, daß bei höherer Temperatur die Affinität des Broms zum Sauerstoff größer ist als die des Chlors. Im ultravioletten Licht trennt sich umgekehrt der Sauerstoff vom Chlor schwerer als vom Brom.

Zur Untersuchung des Einflusses der Konzentration wurden jedesmal $\frac{1}{3}$ -, $\frac{1}{10}$ - und $\frac{1}{100}$ -Lösungen von KClO_3 , KBrO_3 oder KJO_3 gleichzeitig belichtet. Es wurde übereinstimmend gefunden, daß die Konzentration keineswegs, wie Roß bei seinen Versuchen fand, ohne Einfluß auf die Menge der Reaktionsprodukte ist, sondern daß diese mit wachsender Konzentration zunimmt. So lieferte bei gleichzeitiger Belichtung von KClO_3 -Lösungen die $\frac{1}{3}$ -Lösung 0,5 ccm Gas, die $\frac{1}{10}$ -Lösung 0,4 ccm, die $\frac{1}{100}$ -Lösung 0,1 ccm in 3 Stunden; entsprechende KBrO_3 -Lösungen ergaben in $\frac{1}{2}$ Stunde 0,7, 0,5 und 0,1 ccm Gas, KJO_3 -Lösungen in $1\frac{1}{2}$ Stunden 0,6, 0,45 und 0,3 ccm Gas. Roß fand dagegen die Menge des in 10 Minuten gebildeten Halogenids innerhalb der Konzentration $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{100}$ konstant. Vermutlich liegt der Grund für seine abweichenden Resultate wiederum in der geringen Lichtintensität seines Beleuchtungsapparates und der Kürze der Bestrahlungszeit.

Um endlich den Einfluß des Kations auf die Zersetzungsgeschwindigkeit zu prüfen, wurden jedesmal äquimolekulare Lösungen des K- und Na-Salzes derselben Säure gleichzeitig unter gleichen Bedingungen belichtet. Es wurde, in Übereinstimmung mit Roß, gefunden, daß die K- und Na-Salze von allen untersuchten Säuren gleich schnell zersetzt werden. In jedem Zeitpunkte der Zersetzung war der Stand der Flüssigkeitsniveaus in den Röhren der gleiche, bei den schnell zerfallenden Bromaten ebenso wie bei den überaus langsam sich zersetzenden Perchloraten, bei denen $\frac{1}{10}$ -Lösungen 15 Stunden brauchten, um 0,5 ccm Gas zu entwickeln.

Dieses Resultat ist erklärlich. Denn da sowohl die unzersetzten Salze wie auch die aus der Zersetzung resultierenden Halogenide als Salze starker Säuren in verdünnter wässriger Lösung praktisch vollständig dissoziiert sind, besteht die Reaktion ja nur in einer Sprengung des Halogen-Sauerstoff-Ions, wodurch das Gleichgewicht nicht gestört werden kann.

Zusammenfassung.

Es wurde gezeigt, daß die Alkalichlorate, -bromate, -jodate (bzw. -bijodate) und -perjodate in wässriger Lösung durch kräftige Bestrahlung mit ultraviolettem Licht weitgehend in Halogenid und Sauerstoff gespalten werden und daß die Zerlegung bei genügend langer Belichtung quantitativ wird¹⁾. Bei den Perchloraten wurde nur eine sehr geringe Spaltung festgestellt. Die Zersetzungsgeschwindigkeit wurde bei den Bromaten weit größer gefunden als bei den Jodaten, bei den Jodaten wieder größer als bei den Chloraten. Es wurde ferner ermittelt, daß die in gleichen Zeiten gebildeten Mengen der Reaktionsprodukte mit der Konzentration der belichteten Lösung zunehmen, und daß die Natur des Kations ohne Einfluß auf die Zersetzungsgeschwindigkeit ist. Endlich wurden auch die festen Halogenate auf ihre Beständigkeit im ultravioletten Lichte geprüft und gefunden, daß die Chlorate kräftig zerlegt werden, schwächer die Bromate und Perchlorate, unmerklich die Jodate.

¹⁾ Mit der Unbeständigkeit der Halogenate gegen intensive ultraviolette Bestrahlung steht nicht recht die Theorie von Dafert (Monatsh. f. Chem. 29, 235, 1908) über die Entstehung dieser Salze im Chilisalpeter im Einklange. Nach dieser Hypothese soll gerade die Lichtwirkung die natürliche Bildung der Chlorate und Jodate veranlaßt haben.

Über die Einführung von Phosphorsäure in Aminosäuren, Peptone, Albumosen und Proteine.

Von

C. Neuberg und W. Oertel.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der
Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

A. Theoretischer Teil.

Für den Aufbau der Organismen des Tier- und Pflanzenreiches spielt der Phosphor eine bedeutungsvolle Rolle; zählt er doch zu den wenigen Elementen, die in organischer Bindungsform in der Natur angetroffen werden. Verwiesen sei auf die Rolle der Phosphorproteine, der phosphorhaltigen Lipide und die Kohlenhydratphosphorsäuren, die das Skelett der Nucleine darstellen. Zu diesen Körpern, an die sich andere Substanzen zu hochmolekularen Verbindungen anlagern, gesellt sich noch das relativ einfach gebaute Phytin, das als Inositphosphorsäureester aufzufassen ist¹⁾. Auch im intermediären Stoffwechsel der Organismen spielt offenbar die Phosphorsäure eine bedeutsame Rolle. So ist der Vorgang der alkoholischen Gärung an die Bildung und den Zerfall von Kohlenhydratphosphorsäureestern geknüpft, und auch in der tierischen Galle scheint sich der Phosphor an den Stoffwechselforgängen zu beteiligen.

Es ist daher von Interesse, Substanzen kennen zu lernen, die in Beziehung stehen zu diesen wichtigen phosphorhaltigen Naturprodukten. Für die Alkohole ist seit langem bereits eine Methode bekannt, welche die Einführung der Phosphorsäure gestattet. Sie besteht in der Einwirkung von Phosphorsäureanhydrid auf die wasserfreien Verbindungen und ist jüngst von Willstätter wesentlich durch Vornahme der gesamten Prozedur im Vakuum verbessert worden. Für empfindlichere, leicht wieder spaltbare Substanzen jedoch scheint diese Methode nicht an-

¹⁾ C. Neuberg, diese Zeitschr. 5, 443, 1907; 9, 557, 1908.

wendbar. Hierzu bedarf es Reaktionen, die bei niedriger Temperatur und in einem möglichst neutralen Milieu zu verwirklichen sind.

Eine solche Methode ist vor einigen Jahren von Neuberg und Mitarbeitern¹⁾ ausgearbeitet worden. Sie besteht in einer Phosphorylierung in wässriger Lösung mit Phosphoroxchlorid, die man bei Zimmertemperatur oder besser unter Eiskühlung in Gegenwart neutraler säurebindender Agenzien (Calciumcarbonat, Magnesiumoxyd usw.) vornimmt. Mit Hilfe dieses Verfahrens gelang es, die Phosphorsäure mit den verschiedensten Zuckerarten zu kuppeln und so die Saccharosephosphorsäure, die Glucosephosphorsäure, die Galaktosephosphorsäure und die Fructosephosphorsäure rein darzustellen.

Auch ist es möglich gewesen, in einen Eiweißkörper, und zwar das Lactalbumin, Phosphorsäure mit dieser Methode einzuführen und einen Körper zu gewinnen, der in Eigenschaften und Verhalten bemerkenswerte Ähnlichkeiten mit Casein aufwies.

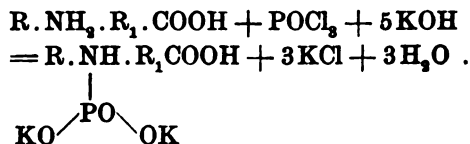
Dann hat K. Langheld²⁾ ein anderes Verfahren angegeben, das in der Einwirkung von Metaphosphorsäureäthylester auf Hydroxyl- und Aminverbindungen besteht. Augenscheinlich handelt es sich zunächst um eine Addition von metaphosphorsaurem Äthyl an die zu phosphorylierenden Körper. Nach den vorliegenden Veröffentlichungen scheint die Verseifung nur bei Zuckerarten zu einer Abspaltung der Äthylgruppe und zu wirklichen Orthophosphorsäureestern zu führen. Bei Substanzen jedoch, die an Stelle der Hydroxylgruppe eine Aminogruppe enthalten, insbesondere bei den Aminosäuren, ist eine solche Entfernung des Äthyls nicht gelungen, und die entstandenen Substanzen sind komplizierte Additionsprodukte des Metaphosphorsäureäthylesters an die betreffenden Aminosäuren; bei den einfachen Monoaminomonocarbonsäuren entstehen dabei Imidopyrophosphorsäurediäthylester.

Es ist klar, daß die Methode der Einführung von Phosphorsäure mittels Phosphoroxchlorid an sich direkt zu Orthophos-

¹⁾ C. Neuberg und H. Pollak, diese Zeitschr. 23, 515, 1910; 26, 529, 1910; Ber. 43, 2060, 1910. — C. Neuberg und E. Kretschmer, diese Zeitschr. 36, 5, 1911.

²⁾ K. Langheld, Ber. 43, 1857, 1910; 44, 2076, 1911.

phorsäureestern führen kann; denn die Reaktion vollzieht sich nach der Gleichung:



Während bei den Hydroxyderivaten die Isolierung des entstandenen Orthophosphorsäureesters keine besonderen Schwierigkeiten verursacht, liegen die Verhältnisse bei den Aminosäuren weit ungünstiger und erschweren die Reindarstellung der Präparate in bedeutendem Maße.

Wie aus den später mitzuteilenden experimentellen Ergebnissen hervorgeht, sind die Phosphorsäureverbindungen der einfachen Aminosäuren außerordentlich empfindliche Substanzen, die durch Säuren wie Laugen, durch Temperaturerhöhung, ja selbst bei Zimmertemperatur unter Wasseraufnahme in die Komponenten zerfallen. Die allgemeine Methode, zu der wir nach zahlreichen Abänderungen und Mißerfolgen gelangt sind, ist folgende:

Die betreffende Aminosäure wird mit der 10fachen Menge Wasser und mit einem Quantum Magnesia usta versetzt, das mehr als hinreichend ist, alle bei der Zersetzung des Phosphoroxychlorids entstehenden und in der Carboxylgruppe der Aminosäure gelegenen negativen Valenzen abzusättigen. Dieses Gemisch, das immer schwach alkalisch reagiert, wird unter guter Eiskühlung von außen lebhaft turbiniert. Währenddessen läßt man im Verlauf von 3 bis 4 Stunden das $1\frac{1}{2}$ bis 2fache der berechneten Menge Phosphoroxychlorid, gelöst im 20fachen Volumen Tetrachlorkohlenstoff, aus einem Tropftrichter hinzutropfen. Nach Beendigung des Eintropfens wird die Turbine noch 2 Stunden im Gang belassen, dann filtriert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Falls größere Mengen Tetrachlorkohlenstoff, von dem ein Teil im Schlamm der Magnesiumsalze zurückbleibt, in das Filtrat gelangen, so läßt man sie im Scheidetrichter ab. Die klare, wässrige Lösung enthält das phosphorylierte Produkt, das bei der Reaktion entstandene Magnesiumchlorid, gelöstes Magnesiumhydroxyd sowie unveränderte Aminosäure. Dieses Gemisch enthält nur Spuren anorganischer Phosphorsäure und gibt dementsprechend mit Magnesiummischung

zunächst keine Fällung; eine solche tritt erst nach einigem Stehen auf infolge Spaltung der Aminosäurephosphorsäureverbindung. Die geringe Trübung, die sehr schnell beim Stehen der filtrierten phosphorylierten Lösung an der Luft eintritt, rührt von einer Ausscheidung von Magnesiumcarbonat durch die Kohlensäure der Luft her. Kocht man dagegen auf, so erhält man schnell eine dicke Fällung von Magnesiumphosphat.

Zur weiteren Verarbeitung muß man, bevor irgendwelche anderen Manipulationen vorgenommen werden dürfen, mit verdünnter Essigsäure neutralisieren. Da man am besten jedes Einengen¹⁾ und Erwärmen der wässrigen Lösungen vermeidet, fällt man nunmehr durch Zugabe von abs. Alkohol. Wenn etwa das $1\frac{1}{3}$ fache Volumen Alkohol hinzugefügt ist, erfolgt Trübung und bei weiterer Zugabe von Alkohol flockige Fällung.

Unter diesen Bedingungen fallen weder Magnesiumchlorid noch Magnesiumacetat, noch auch die unveränderten Aminosäuren, da letztere einerseits aus verdünnter wässriger Lösung durch Alkohol nicht gefällt werden (Glykokoll, Alanin, Pepton und Albumosen), andererseits in der wässrigen Flüssigkeit nur in geringen Mengen in Lösung sind (Tyrosin). Der entstandene weiße flockige Niederschlag setzt sich beim Stehen über Nacht zu Boden, die überstehende Flüssigkeit ist völlig klar und kann durch Abhebern weitgehend entfernt werden. Alsdann filtriert man ab (empfehlenswerter als Absaugen) und wäscht mit 80% igem Alkohol aus, bis im Filtrat kein Chlor mehr nachweisbar ist.

Der Niederschlag ist ein Magnesiumsalz und enthält Stickstoff wie Phosphor. In Wasser löst er sich jedoch nur zum Teil, wohl infolge partieller hydrolytischer Spaltung in Magnesiumphosphat und Aminosäure. Der Niederschlag wird ohne vorherige Trocknung in feuchter Form vom Filter mit Wasser abgespritzt und in einem kleinen Standzylinder mit eingeschliffenem Stopfen mit wenig Wasser gut durchgeschüttelt. Nach 1 Stunde wird von dem zu Boden gesunkenen unlöslichen Anteil abfiltriert und die klare Lösung sofort wieder mit Alkohol gefällt. Man erhält dann abermals einen weißen Niederschlag;

¹⁾ Bei sehr großen Flüssigkeitsmengen kann man die Lösung vor dem Fällen mit Alkohol im Faust-Heimschen Verdunstungsapparat bei Zimmertemperatur auf ein kleineres Volumen bringen.

dieser ist nunmehr klar in Wasser löslich und völlig frei von Chlor und anorganischer Phosphorsäure.

Die wässrige Lösung des so erhaltenen Körpers reagiert alkalisch und zeigt alle Reaktionen einer Aminosäurephosphorsäureverbindung. Hervorzuheben ist ihre große Labilität. Beim Kochen erfolgt alsbald Trübung, die sich zu Flocken von Magnesiumphosphat zusammenballt. Bei kleineren Mengen ist die Zersetzung nach einigen Minuten quantitativ; denn nach dem Abfiltrieren und Auswaschen erweist sich der Niederschlag als stickstofffrei, und im Filtrat sind nur noch Spuren von Phosphorsäure nachweisbar¹⁾.

Was die Zusammensetzung dieser Aminosäurephosphorsäureverbindungen anbetrifft, so ergaben die Analysen beim Tyrosin ein völlig eindeutiges Resultat. Sie zeigen, daß in das Molekül des Tyrosins zwei Phosphorsäurereste eingetreten sind; es liegt nahe, außer der Phosphorylierung der Amino-Gruppe eine solche des Hydroxylrestes anzunehmen.

Trotz vieler darauf verwendeter Mühe haben zahlreiche Darstellungen der Phosphorsäureverbindungen der übrigen Aminosäuren zu keinen voll befriedigenden Ergebnissen geführt. Die unter sich gut übereinstimmenden Analysen zeigen, daß basische Magnesiumsalze monophosphorylierter Aminosäuren vorliegen. Die Haftfestigkeit der Phosphorsäure an den einfachen Aminosäuren ist offenbar sehr gering. Ein mehrfaches Umfällen selbst aus rein wässriger Lösung ist stets mit bedeutenden Verlusten infolge immer sich erneuernder Hydrolyse verbunden. An eine Reinigung, etwa durch Lösen in Säuren und nachfolgende Neutralisation durch Alkalien ist überhaupt nicht zu denken. Das steht auch ganz im Einklang mit dem Verhalten des Phosphors beim Abbau der natürlichen Phosphorproteine. Nur in den ersten Abbaustufen, die noch Albumosencharakter haben, ist selbst bei so schonenden Spaltungen, wie es die Fermenthydrolysen sind, organisch gebundene Phosphorsäure nachweisbar. Mit fortschreitender Verdauung, d. h. mit zunehmender Molekülverkleinerung, werden immer phosphor-

¹⁾ Die Ausfällung der Phosphorsäure ist noch vollständiger, wenn man einige Tropfen Ammoniak hinzugibt, entsprechend der viel größeren Unlöslichkeit des Ammoniummagnesiumphosphats im Vergleich zum Magnesiumphosphat.

ärmere Produkte erhalten, und die Aminosäuren, die man beim Abbau von phosphorhaltigen Eiweißkörpern erhalten hat, sind stets phosphorfrei befunden. Diese Verhältnisse, auf die schon Neuberg und Pollak hingewiesen haben, ließen es nun als möglich erscheinen, daß die künstliche Phosphorylierung von höheren Molekülverbänden, wie von Peptonen, Albumosen und Proteinen, zu beständigeren Phosphorsäureverbindungen führen würde, ein Verhalten, das in biologischer Hinsicht ein besonderes Interesse beanspruchen würde.

Tatsächlich ist es nun möglich, durch die angegebene Methode der Phosphorylierung aus Seidenfibroinpepton, ferner aus Albumosen, wie sie im Witte-Pepton vorliegen, und auch aus Proteinen phosphorsäurehaltige Produkte zu gewinnen, an denen die Phosphorsäure sehr viel fester haftet wie an den Aminosäuren. Die Albumosenverbindung ist beständiger als das Peptonderivat, und phosphoryliertes Eiweiß wiederum resistenter als die Albumosenabkömmlinge. Daraus kann man den Schluß ziehen, daß mit steigendem Molekulargewicht die Haftfestigkeit der Phosphorsäure an Aminosäurenkomplexen zunimmt.

Die Gründe hierfür können verschiedene sein. Sie können einmal im physikalisch-chemischen Charakter der betreffenden Substanzen gelegen sein, der einer Hydrolyse entgegenwirkt. Die Ursache kann aber auch zum Teil darin bestehen, daß in den höheren Molekülverbänden relativ mehr phosphorylierbare freie Hydroxylgruppen als unbesetzte Aminogruppen vorhanden sind.

Die Entwicklung der Eiweißchemie in den letzten Jahren hat auch gelehrt, daß außer in dem lange bekannten Tyrosin in den verschiedenen Oxyaminosäuren Hydroxylgruppen zur Verfügung stehen, und man darf wohl vermuten, daß in den noch unbekanntem Eiweißbausteinen noch mehr hydroxylhaltige Gebilde vorliegen. Da nun erfahrungsgemäß Substanzen mit Bindung der Phosphorsäure am Sauerstoff, also wahre Phosphorsäureester, recht beständig sein können, so würde eine häufigere Veresterung zwischen Hydroxylgruppen der Proteine mit der Phosphorsäure die höhere Beständigkeit der letztgenannten Körper erklären. Das oben angeführte Beispiel des Tyrosins zeigt, daß gleichzeitig Hydroxyl- und Aminogruppen sich mit Phosphorsäure paaren können, so daß man für die natürlichen

Phosphorproteine und die ihnen in vieler Beziehung gleichenden künstlichen Produkte die Konstitution von substituierten Phosphaminsäuren und von wahren Phosphorsäureestern in Betracht ziehen kann. Eine Entscheidung, welche von beiden Möglichkeiten überwiegt, läßt sich zurzeit auch auf Grund von Fermentversuchen nicht erbringen. Denn Pankreasfermente spalten sowohl Polypeptidverbindungen (Eiweißhydrolyse) als auch wahre Ester, z. B. den Äthylester des Leucins¹⁾.

Trotzdem war es von großem Interesse, das Verhalten unserer künstlich phosphorylierten Produkte zu Verdauungsenzymen zu untersuchen. Eine solche Prüfung war bei den Derivaten der einfachen Aminosäuren ihrer erwähnten Zersetzlichkeit wegen unmöglich, da sie ein Stehen im Brutschrank nicht vertragen, ganz abgesehen davon, daß ein Nachweis von abgespaltener Phosphorsäure neben gebundener hierbei auf unüberwindliche Schwierigkeiten stößt. Dagegen war sie ausführbar bei dem phosphorylierten Seidenfibroinpepton, den phosphorylierten Albumosen und den phosphorylierten Proteinen. Es zeigte sich, daß sowohl Pepsin wie Trypsin, letzteres in stärkerem Maße, Phosphorsäure abspalten. Die Loslösung vollzog sich bei den phosphorylierten Peptonen und Albumosen schneller als bei den phosphorylierten Proteinen, wie zu erwarten war. Endlich interessierte noch die Frage, ob die künstlich phosphorylierten Eiweißkörper mit den natürlichen Phosphorproteinen auch die Fähigkeit, mit Labferment bei Gegenwart von löslichen Kalkverbindungen zu gerinnen, gemeinsam haben. Die Versuche ergaben, daß dies tatsächlich der Fall ist, wodurch die Ähnlichkeit unserer künstlichen Produkte mit den natürlichen Körpern von neuem bestätigt wird.

B. Experimenteller Teil.

a) Phosphorylierung des Tyrosins.

3,6 g l-Tyrosin wurden mit 30 g Magnesia usta in 300 ccm Wasser in einem Standgefäß unter Turbinieren verteilt. Nach einer halben Stunde wurde das Standgefäß mit einer Kühlmischung von Eisstücken und Wasser umgeben und dann

¹⁾ O. Warburg, Ber. 38, 187, 1905.

durch einen Tropftrichter eine Lösung von 9 g POCl_3 in 70 ccm CCl_4 tropfenweise hinzugegeben, so daß in 3 bis 4 Stunden alles eingetroppt war. Die Turbinierung wurde noch 1 Stunde fortgesetzt. Ein Geruch nach POCl_3 war alsdann nicht mehr vorhanden. Darauf wurde das Reaktionsgemisch abfiltriert. Die so erhaltene Lösung wurde mit verdünnter Essigsäure vorsichtig versetzt, so daß sie gegen Lackmus eben noch alkalisch reagierte. Die nochmals filtrierte Lösung wurde nunmehr in einem Trockenapparat nach Faust-Heim bis auf etwa 10 ccm eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 100 ccm 96%igem Alkohol verrührt und nach kurzem Stehen abfiltriert und mit 80%igem Alkohol ausgewaschen, bis der Waschalkohol kein Chlor mehr enthielt. Der auf dem Filter verbliebene Rückstand wurde noch feucht in ein Standfläschchen abgespritzt und mit etwa 40 ccm Wasser im ganzen einige Zeit kräftig durchgeschüttelt. Die von einem nicht unbeträchtlichen ungelösten Bodensatz abfiltrierte Flüssigkeit wurde mit dem 3 bis 4fachen Volumen Alkohol versetzt, bis sich der entstehende Niederschlag nicht mehr vermehrte. Nach dem Absitzen wurde filtriert und mit 96%igem, darauf mit absolutem Alkohol und endlich mit wasserfreiem Äther ausgewaschen. Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz bildet ein weißes Pulver. Dasselbe löst sich klar in kaltem Wasser und erteilt diesem schwach alkalische Reaktion. Mit Magnesiummischung bildet sich zunächst kein Niederschlag; derselbe tritt erst bei längerem Stehen oder beim Kochen auf. Mit Molybdänlösung, die durch ihren Salpetersäuregehalt spaltend wirkt, reagiert die Substanz sehr bald. Mit Uranylacetat sowie mit Quecksilberacetat entstehen Niederschläge schwerlöslicher Metallsalze. Kocht man die Verbindung mit verdünnter Essigsäure und übersättigt darauf mit Ammoniak, so scheidet sich Ammoniummagnesiumphosphat in der typischen Form ab, eine Reaktion, die die gleichzeitige Anwesenheit von Phosphor und Magnesium dartut.

Auch bei längerem Kochen mit Wasser (Erwärmen im siedenden Wasserbade) tritt eine derartig vollständige Zersetzung des Niederschlages ein, daß sich nach dem Abfiltrieren und Auswaschen im Filtrat nur noch Spuren von Phosphorsäure, im Niederschlag dagegen kein Stickstoff mehr vorfindet. Eine 1%ige Lösung des Tyrosinphosphorsäureesters zeigt im Polari-

sationsapparat eine schwache Drehung nach rechts (Salze des natürlichen Tyrosins drehen in wässriger Lösung links).

Zur Analyse wurden 0,1091 g der im evakuierten Schwefelsäureexsiccator getrockneten Substanz im Platintiegel vorsichtig verascht. Die Aschenmenge wog 0,0628 g = 57,56% der Substanz.

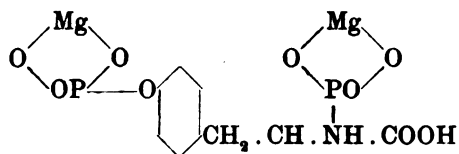
Die in verdünnter Salpetersäure gelöste Asche wurde sodann auf Phosphor analysiert. Die Bestimmung ergab 0,0626 g $Mg_2P_2O_7$ = 15,95% P.

Bemerkenswert ist, daß die Aschenmenge und die Quantität des gewogenen $Mg_2P_2O_7$ fast genau übereinstimmen, woraus sich vermuten läßt, daß die Asche selbst reines $Mg_2P_2O_7$ ist.

Der durch eine besondere Bestimmung ermittelte Mg-Gehalt bestätigte diese Annahme, da auch hierbei die Aschenmenge und das zur Wägung gebrachte $Mg_2P_2O_7$ gut übereinstimmten. 0,0822 g trockener Substanz gaben beim Veraschen 0,0473 g Rückstand; dieser ergab bei der Mg-Bestimmung 0,0468 g $Mg_2P_2O_7$ = 12,43% Mg.

Der Stickstoffgehalt der Substanz wurde nach Kjeldahl ermittelt. 0,4133 g Substanz ergaben 0,0147 g N = 3,56% N.

Diese Zahlen stimmen gut auf einen Körper von der Struktur



Gehalt an:

	Asche	P	Mg	N
Ber.	57,74%	16,07%	12,65%	3,63%
gef.	57,56%	15,95%	12,43%	3,56%

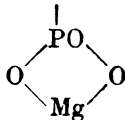
Die Ausbeute an reiner Substanz betrug bei den oben angegebenen Mengen der Ausgangsprodukte 0,5 g. Durch Verdoppelung und Verdreifachung der Menge des zur Phosphorylierung verwendeten $POCl_3$ ließ sich die Ausbeute nicht verbessern. Es wurde durch besondere Versuche ermittelt, daß immer nur rund 17% des angewendeten Tyrosins unter den angegebenen Verhältnissen an Phosphorsäure gebunden werden.

b) Phosphorylierung von α -Alanin.

1,8 g d,l-Alanin wurden mit 150 g Wasser und 10 g Magnesia usta 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur turbiniert und darauf zu dem nunmehr von außen durch Eis gekühlten Gemisch eine Lösung von 6,1 g POCl_3 in 50 ccm CCl_4 im Laufe von 4 Stunden eingetropfelt und dann noch 1 Stunde turbiniert. Die filtrierte Lösung wurde vorsichtig mit stark verdünnter Essigsäure versetzt, bis sie eben noch alkalisch reagierte, und darauf mit dem dreifachen Volumen absoluten Alkohols versetzt. Die weiße flockige Fällung, die sich nach mehreren Stunden zu Boden setzte, wurde abfiltriert und mit 80%igem Alkohol chlorfrei gewaschen. Darauf wurde der Niederschlag mit wenig Wasser geschüttelt, vom Ungelösten abfiltriert und das klare Filtrat wieder mit Alkohol gefällt. Nach einigen Stunden wurde filtriert und zuerst mit 80%igem, dann mit absolutem Alkohol und schließlich mit wasserfreiem Äther gewaschen. Die so gewonnene Substanz, etwa 0,4 g, ist frei von anorganischer Phosphorsäure und von unverändertem Alanin (Alanin fällt aus wässriger 2%iger Lösung durch Zusatz der fünffachen Menge absoluten Alkohols nicht aus, auch nach tagelangem Stehen nicht).

Die erhaltene Substanz löst sich nach längerem Schütteln klar in kaltem Wasser, erteilt diesem alkalische Reaktion und ist durch Alkohol wieder fällbar. Sie gibt auf Zusatz von Magnesiämischung innerhalb von 10 Minuten keine Fällung, erst nach längerem Stehen scheidet sich MgNH_4PO_4 aus. Beim Kochen trübt sich die Lösung schon nach 2 Minuten, es scheidet sich Magnesiumphosphat in Flocken ab. Mit Triketohydrindenhydrat und 1 Tropfen Essigsäure gibt die wässrige Lösung der Substanz beim Kochen die mit Aminosäuren eintretende Blaufärbung.

Die Analysen der Substanz lieferten trotz verschiedener Abänderungen der Darstellungsmethode keine mit den theoretisch denkbaren Alaninphosphorsäureestern befriedigend übereinstimmenden Resultate. Sie ergaben 66,1 bis 67,1% Asche, 17,8 bis 18,5% P, 15,2 bis 15,5% Mg und 1,5 bis 2,1% N. Einem Körper von der Struktur

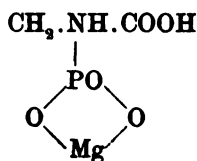


entsprechen 58,2% Asche, 16,2% P, 12,7% Mg und 7,3% N. Die Analysenresultate zeigen also einen höheren Aschengehalt und einen geringeren N-Gehalt. Vielleicht ist das gewonnene Produkt ein Gemisch basischer Mg-Salze einfach und doppelt phosphorylierten Alanins.

c) Phosphorylierung von Glykokoll.

Die Phosphorylierung des Glykokolls geschah in genau derselben Weise wie die des Alanins, so daß auf eine Beschreibung der Arbeitsmethode hier verzichtet werden kann. Es wurden verwendet 3,7 g Glykokoll, 12 g MgO und 10 g POCl₃, gelöst in 100 ccm CCl₄.

Das erhaltene Produkt war wieder ein weißer amorpher Körper, der die gleichen Eigenschaften aufwies wie das phosphorylierte Alanin. Seine wässrige Lösung trübte sich beim Aufkochen sofort. Die Analysen verschiedener Produkte ergaben einen Gehalt von 59,2 bis 60,6% Asche, 15,2 bis 15,4% P, 14,0 bis 15,3% Mg und 4,8 bis 5,2% N. Einem einfach phosphorylierten Glykokoll von der Struktur



würden 62,8% Asche, 17,5% P, 13,7% Mg und 7,9% N entsprechen.

d) Phosphorylierung von Seidenfibroinpepton und von Albumosen des Witte-Peptons.

Zur Verwendung gelangten bestes Witte-Pepton (Albumosen) und reines Seidenfibroinpepton. Je 4,5 g Substanz wurden in 200 g Wasser gelöst. Das Lösen des Witte-Peptons geschieht am besten durch Eintragen des trockenen Pulvers in das siedende Wasser; wenn alles eingetragen ist, läßt man noch 5 Minuten kochen und dann erkalten. Filtration ist nicht notwendig. Das Seidenfibroinpepton ist schon in kaltem Wasser klar löslich. Die Lösungen wurden darauf in derselben Art, wie bei den Aminosäuren beschrieben, mit 10 g POCl₃ in 100 ccm CCl₄ bei Gegenwart von überschüssigem MgO (12 g) unter Eis-

kühlung phosphoryliert. Die filtrierte und mit verdünnter Essigsäure neutralisierte Lösung enthält beträchtliche Mengen organisch gebundener Phosphorsäure. Sie wurde dann in der üblichen Weise mit Alkohol gefällt, der Niederschlag abfiltriert, chlorfrei gewaschen und nochmals aus wässriger Lösung mit Alkohol umgefällt.

Die so gereinigten Produkte zeigen folgende Eigenschaften: Das phosphorylierte Witte-Pepton sieht rein weiß aus, das aus Seidenfibroin erhaltene Produkt blaßgelb. Beide lösen sich leicht und klar in kaltem Wasser. Die schwach alkalischen Lösungen trüben sich nicht beim Kochen, auch bei 15 Minuten langem Sieden nicht. Mit Magnesiamischung gibt der Witte-Peptonester erst nach 20 Minuten eine deutliche Fällung, bei dem Seidenfibroinpeptonester tritt die Fällung wesentlich schneller ein. Kocht man die Substanzen mit verdünnter Essigsäure und übersättigt darauf mit Ammoniak, so fällt MgNH_4PO_4 aus. Mit verdünnter Salpetersäure geben die wässrigen Lösungen der Produkte beim Kochen die Xanthoproteinreaktion, mit Triketohydrindenhydrat + 1 Tropfen Essigsäure nach einigem Kochen Blaufärbung.

Die Analysen ergaben folgende Resultate:

0,1245 g phosphoryliertes Witte-Pepton hinterließen beim Verbrennen 0,0178 g Asche = 14,30%. Die Asche ergab, in wenig verdünnter HCl gelöst und mit NH_3 übersättigt, einen Niederschlag von MgNH_4PO_4 der beim Glühen 0,0161 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 3,61% P lieferte. Im Filtrat des MgNH_4PO_4 -Niederschlages wurde nach dem Einengen auf ein kleineres Volumen durch Zusatz von Na_3HPO_4 noch eine geringe Menge MgNH_4PO_4 gefällt, die beim Glühen 0,0048 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ hinterließ, so daß der Gesamtgehalt der Substanz an Mg 3,70% beträgt.

0,2518 g getrocknetes phosphoryliertes Seidenfibroinpepton ergaben beim Verbrennen 0,1172 g Asche = 46,54%. Die Asche gab, in wenig verdünnter HCl gelöst und mit NH_3 übersättigt, einen Niederschlag von MgNH_4PO_4 , der beim Glühen 0,0971 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 10,76% P ergab. Im Filtrat des MgNH_4PO_4 -Niederschlages wurde wieder durch Zusatz von Na_3HPO_4 das noch in Lösung befindliche Mg quantitativ gefällt; dieser Niederschlag hinterließ beim Glühen 0,0303 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, so daß der Gesamtgehalt der Substanz an Mg 11,04% beträgt.

Der reichliche Gehalt der Seidenfibroinpeptonphosphorsäureverbindung an P darf wohl nach den eingangs gemachten Darlegungen mit der starken Beteiligung des Tyrosins an seinem Aufbau in Zusammenhang gebracht werden.

Es wurde nunmehr untersucht, ob die phosphorylierten Albumosen und Peptone sich ähnlich verhalten wie die beim fermentativen Abbau der Phosphorproteine auftretenden phosphorhaltigen Albumosen. Bemerkenswert ist zunächst, daß sie wie diese mit Ferriammonsulfatlösung eine dicke käsig-fällige Fällung geben, eine Reaktion, die E. Salkowski für die phosphorhaltigen peptischen Verdauungsalbumosen des Caseins, die sogenannten Paranucleinsäuren, angegeben hat.

Weiter wurde der Einfluß der Verdauungsfermente auf die phosphorylierten Peptone und Albumosen untersucht. Je 10 ccm von 2⁰/₁₀igen Lösungen der Substanzen wurden einmal nach vorsichtiger Neutralisation mit stark verdünnter Salzsäure mit einer Messerspitze Pepsin, ein zweites Mal mit ebensoviel Trypsin, ein drittes Mal ohne Ferment in verkorkten Reagensgläsern im Brutschrank auf Körpertemperatur erwärmt. Um Fäulnis zu vermeiden, wurden zu jeder Probe noch einige Tropfen Toluol gegeben. Nach 3 Tagen wurde filtriert und mit Magnesia-mischung auf anorganische Phosphorsäure geprüft. Beim phosphorylierten Witte-Pepton gab die fermentfreie Lösung kaum eine Fällung, die mit Pepsin oder Trypsin versetzten Lösungen gaben dagegen sofort einen deutlichen Niederschlag von $MgNH_4PO_4$. Beim phosphorylierten Seidenfibroinpepton gab die fermentfreie Lösung eine schwache Fällung, die mit Pepsin behandelte eine wesentlich stärkere, die mit Trypsin versetzte eine noch kräftigere Fällung von $MgNH_4PO_4$.

Die künstlichen Phosphoralbumosen und -peptone spalten also in bemerkenswerter Analogie mit den natürlichen Produkten unter dem Einflusse der Verdauungsfermente langsam Phosphorsäure in anorganischer Form ab.

e) Phosphorylierung von Blutglobulin und Casein.

1. Darstellung der Präparate.

Da die phosphorylierten Eiweißkörper, wie Neuberg und Pollak bei der Phosphorylierung des Lactalbumins sahen, recht beständige Produkte sind und eine Umfällung aus alka-

lischer Lösung durch Zusatz von Säure vertragen, wurde bei der Phosphorylierung des Globulins und Caseins so verfahren, daß die Eiweißkörper, direkt in verdünntem Alkali gelöst, phosphoryliert wurden.

Eine Phosphorylierung des Caseins, das ja bereits Phosphorsäure enthält, erschien deshalb von Interesse, um festzustellen, ob es bei unserer Methode der Phosphorylierung noch mehr Phosphorsäure aufzunehmen imstande ist.

Für jede Phosphorylierung wurden 190 ccm 33%iger Kalilauge auf 1 l aufgefüllt. Von dieser verdünnten Lauge wurden zunächst je 250 ccm in einen Standzylinder von 3 l Inhalt gegeben und turbiniert. In die kräftig gerührte und durch Eis gekühlte Lauge wurden darauf 18 g reines Blutglobulin¹⁾, bzw. 18 g Casein nach Hammarsten in kleinen Portionen langsam eingetragen. Durch diese Art der Lösung vermeidet man ein Zusammenklumpen des Eiweißes. In die durch Eis von außen dauernd gekühlten Lösungen wurden darauf gleichzeitig im Laufe von 4 Stunden der Rest der Lauge und eine Lösung von 45 g POCl_3 in 200 ccm CCl_4 eingetropft, so daß die turbinierte Flüssigkeit immer gerade alkalisch blieb. Zum Schluß wurde von einer kleinen Menge Niederschlag abgesaugt, der sich durch die koagulierende Wirkung des CCl_4 auf Eiweiß gebildet hatte. Darauf wurde mit verdünnter Salzsäure gefällt. Zur vollständigen Ausflockung bedarf es eines größeren Überschusses an Salzsäure. Mit Essigsäure gelingt die Fällung nicht, da diese phosphorylierten Eiweißkörper in Alkaliacetaten löslich sind.

Die weiße, käsige Fällung setzte sich bald zu Boden und wurde nach zweimaligem Dekantieren mit $1\frac{1}{2}$ l Wasser durch Absaugen auf einer möglichst großen Nutsche isoliert und zweimal mit Wasser gewaschen. Es empfiehlt sich, als Filter eine doppelte Lage von Kolerleinewand zu verwenden, da bei Benutzung von Papierfiltern die nachfolgende Ablösung des Niederschlages zu einer Verunreinigung durch Cellulosefasern führt. Die gut abgepreßte Fällung wurde alsdann in einem großen Porzellanmörser mit 400 ccm abs. Alkohol gründlich verrieben. Nun wird wiederum auf Leinewand abgesaugt, mit abs. Alkohol

¹⁾ Das verwendete Präparat war praktisch phosphorfrei. 2 g lieferten nach dem Verschmelzen mit Soda und Salpeter mit Molybdänmischung in salpetersaurer Lösung nur eine Gelbfärbung.

und dann mit wasserfreiem Äther nachgewaschen. Man erhält so die Verbindungen in Form von weißen trockenen Pulvern; Ausbeute etwa 12 g. Das Verreiben mit abs. Alkohol ist unerlässlich, da nur die so bewirkte Entwässerung zu brauchbaren Produkten führt, während die nicht mit Alkohol behandelten Substanzen beim Trocknen gelbbraune hornartige Gebilde liefern, die ganz andere physikalische Eigenschaften besitzen. Diese Umstände erinnern weitgehend an das Verhalten des natürlichen Caseins bei seiner Gewinnung aus Milch.

Die so dargestellten phosphorylierten Eiweißkörper lösen sich nicht in Wasser oder Alkohol; sie zeigen saure Reaktion. In verdünnten Alkalien und in Ammoniak lösen sie sich leicht und sind durch Mineralsäure wieder fällbar. Sie benehmen sich also wie richtige Säuren, was das natürliche Casein bekanntlich auch tut. Kocht man die Substanzen, die keine anorganische Phosphorsäure enthalten, mit Wasser, so wird auch bei langem Sieden keine Phosphorsäure abgespalten. Erst nach längerem Kochen mit Salzsäure oder Lauge wird Phosphorsäure im Filtrat nachweisbar. Dieses Verhalten zeigt deutlich, wieviel fester die Phosphorsäure in den hochmolekularen Proteinen haftet als in den phosphorylierten Albumosen, Peptonen und Aminosäuren.

Die phosphorylierten Proteine verhalten sich im übrigen wie echte Eiweißkörper. Sie geben die charakteristischen Eiweißreaktionen: die Biuretreaktion, die Xanthoproteinprobe, Blaufärbung mit Triketohydrindenhydrat, Schwärzung alkalischer Bleilösung und die Reaktionen nach Millon und Hopkins.

Die Analysen ergaben folgende Zahlen:

1,9897 g phosphoryliertes Globulin ergaben nach dem Schmelzen mit Soda und Salpeter $0,1264 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 1,77\%$ P.

1,9869 g phosphoryliertes Casein ergaben nach dem Schmelzen mit Soda und Salpeter $0,1255 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 1,76\%$ P.

0,2944 g phosphoryliertes Globulin ergaben nach Kjeldahl $0,0375 \text{ g N} = 12,74\%$ N.

0,2932 g phosphoryliertes Casein ergaben nach Kjeldahl $0,0415 \text{ g N} = 14,15\%$ N.

Aus diesen Resultaten ersieht man zunächst, daß das natürliche Casein, das in Übereinstimmung mit Hammarsten¹⁾

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 227, 1883 und 9, 273, 1885.

0,85 % P enthielt, bei der Phosphorylierung noch Phosphorsäure aufgenommen hat. Bemerkenswert ist ferner, daß die beiden analysierten Produkte ziemlich genau den gleichen Gehalt an P aufweisen. Das von Neuberg und Pollak früher erhaltene phosphorylierte Lactalbumin enthielt 1,25 % P.

2. Verhalten der phosphorylierten Proteine zu Enzymen.

Von Interesse war die Feststellung, ob die dargestellten Produkte noch einer Einwirkung von Fermenten zugänglich sind. Das ist sowohl hinsichtlich der Angreifbarkeit durch Pepsin und Trypsin als auch durch Lab der Fall.

a) Wirkung von Pepsin und Trypsin.

Je 1 g phosphoryliertes Globulin und Casein wurden mit 15 ccm Wasser und 10 ccm Verdauungssalzsäure (nach E. Salkowski erhalten durch Verdünnen von 10 ccm 25 % iger Salzsäure auf 1 l) digeriert und eine Messerspitze Pepsin zugegeben. Zur Kontrolle wurden auch je 1 g nichtphosphoryliertes Blutglobulin und Casein in derselben Weise mit 15 ccm Wasser, 10 ccm Verdauungssalzsäure und Pepsin angesetzt.

Ferner wurden je 1 g phosphoryliertes Globulin und Casein mit 25 ccm Wasser, einer Messerspitze Trypsin und tropfenweise mit so viel Ammoniak versetzt, daß die Flüssigkeit eben alkalisch reagierte. Zur Kontrolle wurde auch hier wieder je 1 g der nicht phosphorylierten Eiweißkörper mit den gleichen Mengen Wasser, Ammoniak und Trypsin hingestellt.

Sämtlichen Mischungen wurde endlich, um Fäulnis zu vermeiden, 1 ccm Toluol zugefügt und die verschlossenen Fläschchen darauf im Brutschrank sich selbst überlassen.

Nach 3 Tagen zeigten die Verdauungsgemische folgende Eigenschaften:

1. Phosphoryl. Glob. + Pepsin: fast klar gelöst, das Filtrat gibt keine Fällung mit Mg-Mischung, aber einen dicken, flockigen Niederschlag mit Ferriammonsulfat.
2. Nichtphosphoryl. Glob. + Pepsin: wenig gelöst; Filtrat keine Fällung mit Mg-Mischung oder Ferriammonsulfat.
3. Phosphoryl. Glob. + Trypsin: zum größten Teil gelöst, schwache Fällung mit Mg-Mischung.

4. Nichtphosphoryl. Glob. + Trypsin: kaum gelöst, Filtrat keine Fällung mit Mg-Mischung.

5. Phosphoryl. Cas. + Pepsin: zum größten Teil gelöst, sehr deutliche Fällung mit Mg-Mischung, kräftige Fällung mit Ferriammonsulfat.

6. Nichtphosphoryl. Cas. + Pepsin: zum Teil gelöst, keine Fällung mit Mg-Mischung, kräftige Reaktion mit Ferriammonsulfat.

7. Phosphoryl. Cas. + Trypsin: zum größten Teil gelöst, sehr deutliche Fällung mit Mg-Mischung.

8. Nichtphosphoryl. Cas. + Trypsin: zum größten Teil gelöst, deutliche Fällung mit Mg-Mischung.

Diese Beobachtungen zeigen, daß durch die Einführung der Phosphorsäure die Verdaubarkeit der Eiweißkörper keineswegs aufgehoben ist.

Bemerkenswert ist ferner, daß die Phosphorsäure im phosphorylierten Globulin sehr langsam abgespalten wird, bei der peptischen Verdauung scheinbar überhaupt nicht; wenigstens gab das Verdauungsgemisch 1 auch nach 8 tägigem Stehen im Brutschrank noch keine wahrnehmbare Reaktion auf anorganische Phosphorsäure. Das phosphorylierte Globulin verhält sich also gegen Pepsin ähnlich wie das natürliche Casein (s. oben unter 6.).

Beim phosphorylierten Casein zeigt sich, daß die durch die Phosphorylierung neu eingeführte Phosphorsäure wohl leichter durch Fermentwirkung abgespalten wird als die bereits im natürlichen Casein vorhandene.

β) Wirkung von Labferment.

Die mehrfach hervorgehobene Analogie der künstlich phosphorylierten Proteine mit den natürlichen Eiweißkörpern erstreckt sich bemerkenswerterweise auch auf die Fähigkeit, mit Labferment zu gerinnen. Für die Labgerinnung ist bekanntlich die Gegenwart löslicher Kalkverbindungen erforderlich; es ist daher nötig, die phosphorylierten Produkte in lösliche Kalksalze zu verwandeln. Dies gelingt leicht nach einer Vorschrift, die Courant¹⁾ für die Herstellung labungsfähiger Caseinlösungen gegeben hat.

¹⁾ G. Courant, Arch. f. d. ges. Physiol. 50, 135, 1891.

0,3 g phosphoryliertes Globulin liefern beim Verreiben mit 10 ccm Kalkwasser eine fast klare Lösung, die bei Zugabe von einigen Tropfen starker Lablösung bei Zimmertemperatur einen dicken Niederschlag gibt, der sich nach kurzem Stehen flockig zusammenballt. Auch das phosphorylierte Casein zeigt, in der angegebenen Weise in Kalkwasser gelöst, die Eigenschaft, mit Lablösung fast momentan bei Zimmertemperatur eine Fällung zu geben. Da nichtphosphoryliertes Globulin unter denselben Bedingungen keine labungsfähigen Lösungen liefert, hat allem Anschein nach der Phosphorsäurerest für das Zustandekommen des Labungsvorganges eine besondere Bedeutung.

Eingehende Untersuchungen hierüber sind im Gange.

Druckfehlerberichtigung zu der Arbeit: „L. Michaelis und P. Rona, Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe. III.“

(Diese Zeitschr. Bd. 60, S. 76.)

Die letzte Tabelle auf der Seite lies
„Glycerin 0,2 n“
anstatt „Glucosid 0,2 n“.

Autorenverzeichnis.

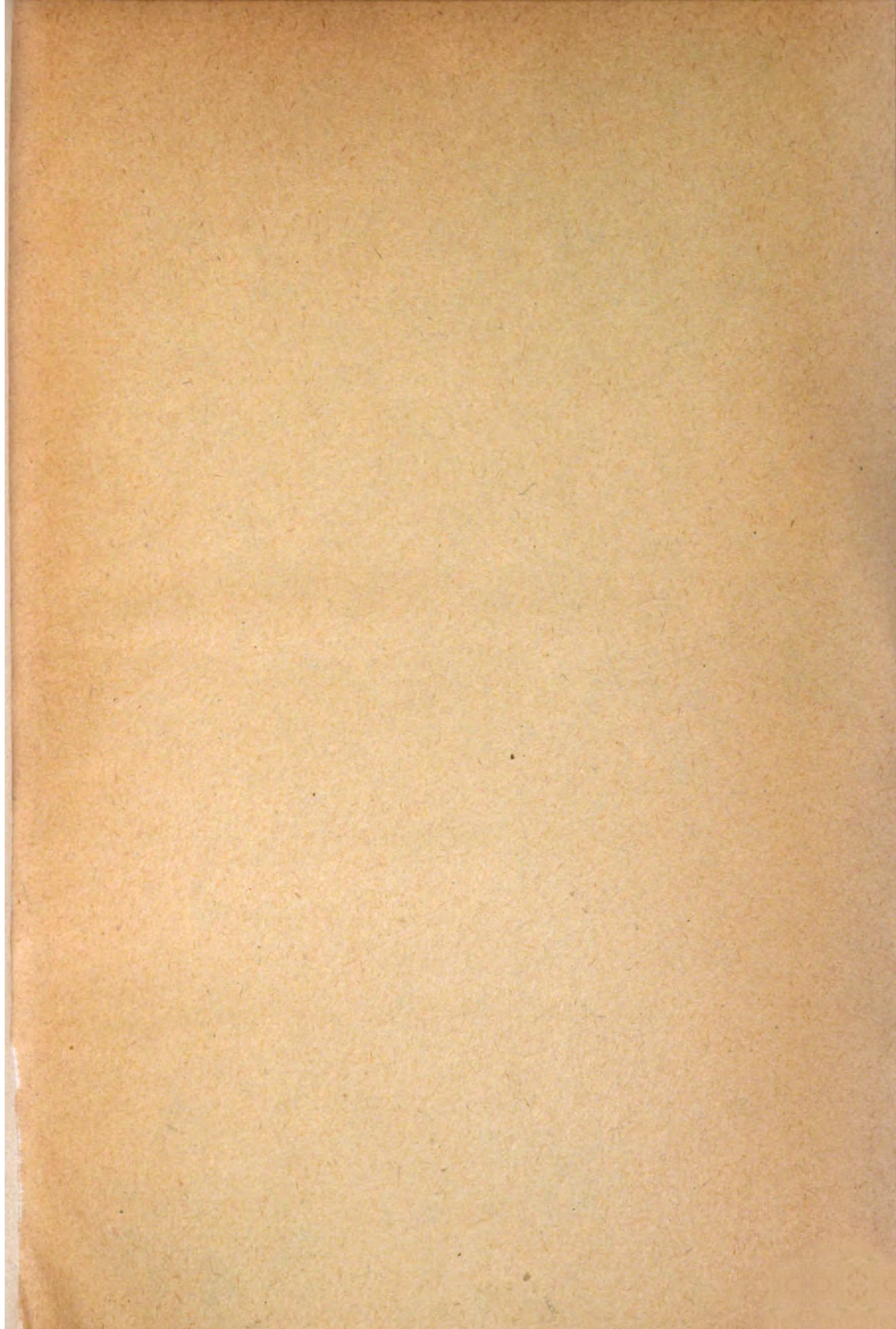
- Bach, A. Über das Wesen der sogenannten Tyrosinasewirkung. S. 221.
- Bernardi, Alessandro. Über das Pepton. I. S. 58.
- Bieling, R. Experimentelle Untersuchungen über die Sauerstoffversorgung bei Anämien. S. 421.
- Cramér, Harald, siehe Euler und Cramér.
- Doerr, R., und R. Pick. Untersuchungen über ein für die Art nicht spezifisches Eiweißantigen zellulären Ursprunges. S. 257.
- Dreyer, Georges, und E. W. Ainley Walker. Kritische Erörterung der Frage der tödlichen Minimaldosis und ihrer Beziehung zum Zeitfaktor. S. 112.
- Elmendorf, Fritz. Über verminderte Blutalkalesenz bei experimenteller Urämie. S. 438.
- Euler, Hans, und Harald Cramér. Über die Anpassung von Mikroorganismen an Gifte. S. 25.
- und Björn Palm. Über die Plasmolyse von Hefezellen. S. 97.
- Frank, Leonhard, siehe Schloß und Frank.
- Gutmann, S., und F. Schlesinger. Über die Bestimmung des Chlors im Blutserum. S. 283.
- Höber, Rudolf, und Otto Nast. Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen. I. S. 131.
- Hottinger, Rob. Einige Abänderungen der Methode der Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl. S. 345.
- Izar, Guido. Synthetische Antigene zur Meistagminreaktion bei bösartigen Geschwülsten. IV. S. 320.
- Katz, D. A., und D. R. Lichtenstern. Über eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels nach Laparotomie. S. 318.
- Kozawa, Shuzo. Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen. II. S. 146. III. S. 231.
- Kraus, Oscar. Bemerkung zu der Mitteilung von L. Michaelis: „Eine neue Mikroanalyse des Zuckers“. S. 344.
- Lénard, D. Beitrag zur Kenntnis des Pepsins. S. 43.
- Lichtenstern, D. R., siehe Katz und Lichtenstern.
- Löb, Walther. Über die Bildung des Glykokolls aus Oxalsäure. S. 159.
- Über die Einwirkung der stillen Entladung auf Stärke und Glykokoll. S. 286.
- Michaelis, L. Zur Theorie der elektrolytischen Dissoziation der Fermente. S. 91.
- und H. Pechstein. Über die verschiedenartige Natur der Hemmungen der Invertasewirkung. S. 79.
- und P. Rona. Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe. III. S. 62.
- — Druckfehlerberichtigung. S. 508.
- Morawitz, P., und J. Chandler Walker. Über ein tonometrisches Verfahren zur Bestimmung des Gleichgewichtes zwischen Säuren und Basen im Organismus. S. 395.
- Nast, Otto, siehe Höber und Nast.
- Neuberg, Carl, und Ernst Welde. Phytochemische Reduktionen. I. S. 472.
- und W. Oertel. Über die Einführung von Phosphorsäure in Aminosäuren, Peptone, Albumosen und Proteine. S. 491.

- Oertel, W. Über den Einfluß ultravioletten Lichtes auf halogensauerstoffsäure Alkalien. S. 480.
— siehe Neuberg und Oertel.
- Palladin, W. Über die Bedeutung des Wassers bei den Prozessen der alkoholischen Gärung und der Atmung der Pflanzen. S. 171.
- Palm, Björn, siehe Euler und Palm.
- Pawel, E. Ein Beitrag zur Kenntnis des Stoffwechsels während der Narkose. S. 352.
- Pechstein, H., siehe Michaelis und Pechstein.
- Pick, R., siehe Doerr und Pick.
- Pinkus, S. N. Ein neuer Extraktionsapparat. S. 311.
- Ritter, G. E. Ammonnitrat und freie Salpetersäure als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. S. 370.
- Rona, P., siehe Michaelis und Rona.
- Salus, Gottlieb. Biologische Versuche mit Organplasma. S. 1.
- Schlesinger, F., siehe Gutmann und Schlesinger.
- Schloß, Ernst, und Leonhard Frank. Tricalciumphosphat als Knochenbildner beim menschlichen Säugling. S. 378.
- Schwyzler, F. Einfluß chronischer Fluorzufuhr auf den Chlor- und Calciumstoffwechsel. S. 82.
- Schwyzler, F. Die Geldrollenbildung im Blute vom kolloidchemischen Standpunkte aus. S. 297.
— Die Oberflächenspannung der Leukocyten und deren Beeinflussung. S. 306.
— Acidose und Anstrengung. S. 310.
— Beobachtungen an Leukocyten bei Variationen der Ionenkonzentration. S. 447.
— Die Rolle der Leukocyten beim Entzündungsphänomen, ein kontakteletrisches Problem. S. 454.
- Steche, O., siehe Waentig und Steche.
- Vernon, H. M. Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipiden. II. S. 202.
- Walker, E. W. Ainley, siehe Dreyer und Walker.
— J. Chandler, siehe Morawitz und Walker.
- Waentig, P., und O. Steche. Über die fermentative Hydroperoxydzersetzung. S. 463.
- Wedemann, W. Über die Scharingersche Formaldehyd-Methylenblau-Reaktion und einige andere Fermentreaktionen bei Ziegenmilch. S. 330.
- Welde, Ernst, siehe Neuberg und Welde.

Autorenverzeichnis.

- Bach, A. Über das Wesen der sogenannten Tyrosinasewirkung. S. 221.
- Bernardi, Alessandro. Über das Pepton. I. S. 56.
- Bieling, R. Experimentelle Untersuchungen über die Sauerstoffversorgung bei Anämien. S. 421.
- Cramér, Harald, siehe Euler und Cramér.
- Doerr, R., und R. Pick. Untersuchungen über ein für die Art nicht spezifisches Erweißantigen zellulären Ursprunges. S. 257.
- Dreyer, Georges, und E. W. Ainsley Walker. Kritische Erörterung der Frage der tödlichen Minimaldosis und ihrer Beziehung zum Zeitfaktor. S. 112.
- Elmendorf, Fritz. Über verminderte Blutalkalescenz bei experimenteller Urämie. S. 438.
- Euler, Hans, und Harald Cramér. Über die Anpassung von Mikroorganismen an Gifte. S. 25.
- und Björn Palm. Über die Plasmolyse von Hefezellen. S. 97.
- Frank, Leonhard, siehe Schloß und Frank.
- Gutmann, S., und F. Schlesinger. Über die Bestimmung des Chlors im Blutserum. S. 233.
- Höber, Rudolf, und Otto Nast. Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen. I. S. 131.
- Hottinger, Rob. Einige Abänderungen der Methode der Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl. S. 345.
- Izar, Guido. Synthetische Antigene zur Meiostragminreaktion bei bösartigen Geschwülsten. IV. S. 320.
- Katz, D. A., und D. R. Lichtenstern. Über eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels nach Laparotomie. S. 318.
- Kozawa, Shuzo. Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen. II. S. 146. III. S. 231.
- Kraus, Oscar. Bemerkung zu der Mitteilung von L. Michaelis: „Eine neue Mikroanalyse des Zuckers“. S. 344.
- Lénard, D. Beitrag zur Kenntnis des Pepsins. S. 43.
- Lichtenstern, D. R., siehe Katz und Lichtenstern.
- Löb, Walther. Über die Bildung des Glykokolls aus Oxalsäure. S. 159.
- Über die Einwirkung der stillen Entladung auf Stärke und Glykokoll. S. 286.
- Michaelis, L. Zur Theorie der elektrolytischen Dissoziation der Fermente. S. 91.
- und H. Pechstein. Über die verschiedenartige Natur der Hemmungen der Invertasewirkung. S. 79.
- und P. Rona. Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe. III. S. 62.
- — Druckfehlerberichtigung. S. 508.
- Morawitz, P., und J. Chandler Walker. Über ein tonometrisches Verfahren zur Bestimmung des Gleichgewichtes zwischen Säuren und Basen im Organismus. S. 395.
- Nast, Otto, siehe Höber und Nast.
- Neuberg, Carl, und Ernst Welde. Phytochemische Reduktionen. I. S. 472.
- und W. Oertel. Über die Einführung von Phosphorsäure in Aminosäuren, Peptone, Albumosen und Proteine. S. 491.

- Oertel, W. Über den Einfluß ultraviolett Lichtes auf halogensauerstoffsäure Alkalien. S. 480.
— siehe Neuberg und Oertel.
- Palladin, W. Über die Bedeutung des Wassers bei den Prozessen der alkoholischen Gärung und der Atmung der Pflanzen. S. 171.
- Palm, Björn, siehe Euler und Palm.
- Pawel, E. Ein Beitrag zur Kenntnis des Stoffwechsels während der Narkose. S. 352.
- Pechstein, H., siehe Michaelis und Pechstein.
- Pick, R., siehe Doerr und Pick.
- Pinkus, S. N. Ein neuer Extraktionsapparat. S. 311.
- Ritter, G. E. Ammonitrat und freie Salpetersäure als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. S. 370.
- Rona, P., siehe Michaelis und Rona.
- Salus, Gottlieb. Biologische Versuche mit Organplasma. S. 1.
- Schlesinger, F., siehe Gutmann und Schlesinger.
- Schloß, Ernst, und Leonhard Frank. Tricalciumphosphat als Knochenbildner beim menschlichen Säugling. S. 378.
- Schwyzler, F. Einfluß chronischer Fluorzufuhr auf den Chlor- und Calciumstoffwechsel. S. 32.
- Schwyzler, F. Die Geldrollenbildung im Blute vom kolloidchemischen Standpunkte aus. S. 297.
— Die Oberflächenspannung der Leukocyten und deren Beeinflussung. S. 306.
— Acidose und Anstrengung. S. 310.
— Beobachtungen an Leukocyten bei Variationen der Ionenkonzentration. S. 447.
— Die Rolle der Leukocyten beim Entzündungsphänomen, ein kontaktetes Problem. S. 454.
- Steche, O., siehe Waentig und Steche.
- Vernon, H. M. Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipiden. II. S. 202.
- Walker, E. W. Ainley, siehe Dreyer und Walker.
— J. Chandler, siehe Morawitz und Walker.
- Waentig, P., und O. Steche. Über die fermentative Hydroperoxydzersetzung. S. 463.
- Wedemann, W. Über die Scharingersche Formaldehyd-Methylenblau-Reaktion und einige andere Fermentreaktionen bei Ziegenmilch. S. 330.
- Welde, Ernst, siehe Neuberg und Welde.



ALF Collections Vault



3 0000 091 338 800