



3617
181

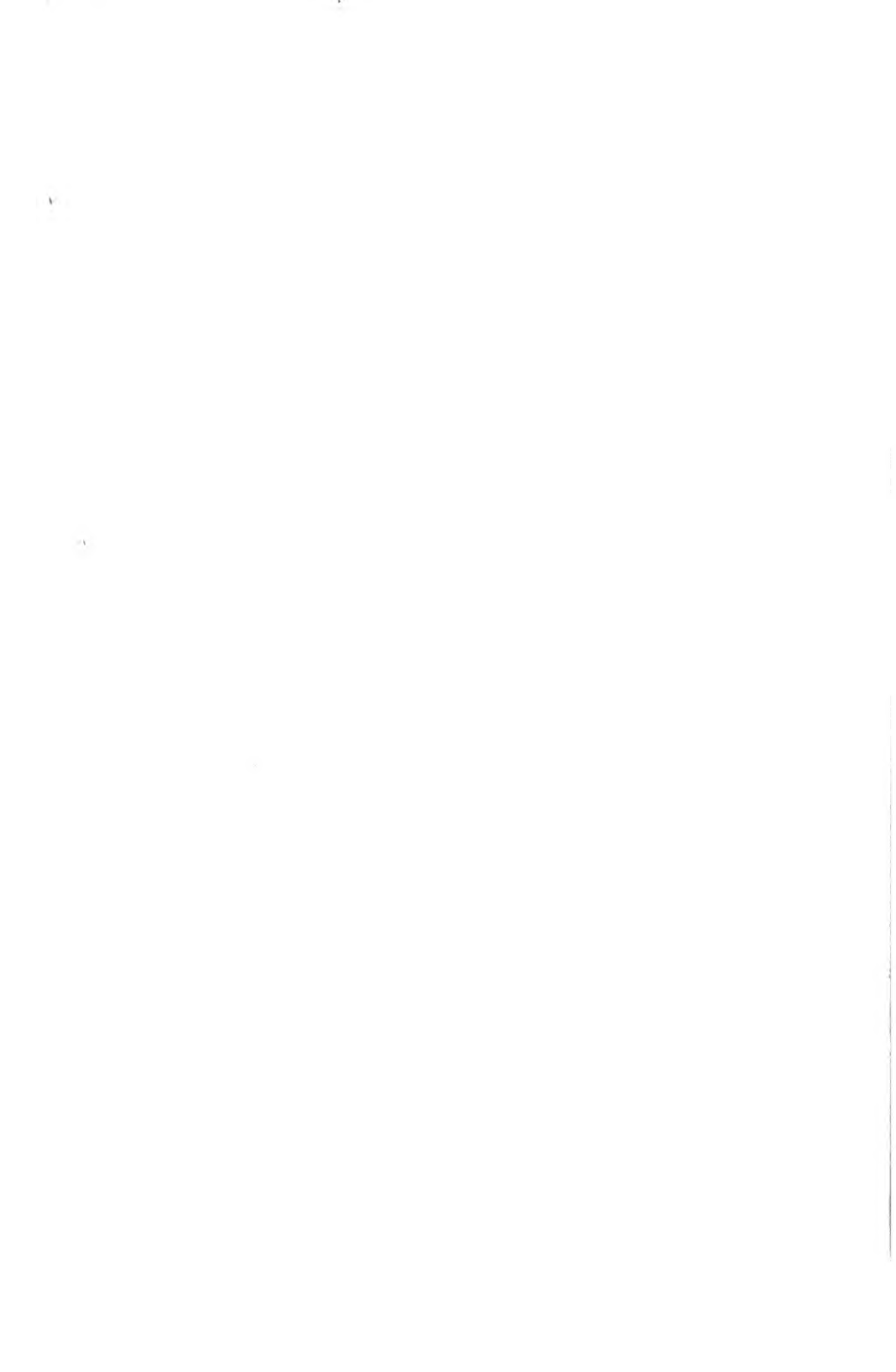
Library of



Princeton University.

Presented by
Charles Milliston M. Alpin,
Class of '88.





Biochemische Zeitschrift.

Beiträge
zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. v. 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. Durrig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forsman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, P. Hart-Budapest, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, E. Koberl-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolt-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, H. Mollsch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Faulstich-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. F. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Roehmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Slegried-Leipzig, S. P. L. Sørensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklassa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., H. v. Tappeler-München, H. Thoms-Berlin, A. J. J. Vandevelde-Gent, O. Warburg-Berlin, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgenuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Zweiundachtzigster Band.



MORPHOLOGICAL LABORATORY
GREEN SCHOOL OF SCIENCE
PRINCETON, N. J.

Berlin.

Verlag von Julius Springer.

1917.

(RECAP)

8617
.181

(1917)

82. Pt.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Berczeller, L. Die Oberflächenspannung von stereoisomeren Verbindungen. (Vorläufige Mitteilung)	1
Kende, Sigmund. Die Wirkung der Seifen auf den fermentativen Abbau der Stärke und des Glykogens	9
Ducháček, F. Über Bacillus paralacticus	31
Straub, Walther. Über die Entwicklung der typischen Blattglykoside in der keimenden und wachsenden Digitalispflanze. Mit 3 Tafeln.	48
Salkowski, E. Notiz über Vorläufer der Methode von Kjeldahl zur Bestimmung des Stickstoffs	60
Salkowski, E. Zur Frage der Säurewirkung beim Pflanzenfresser und Fleischfresser	64
Höber, Rudolf. Der Begriff „Nährwert“	68
Loewit, M. Anaphylaxiestudien. Ein Anaphylatoxin pflanzlichen Ursprungs	72
Laurin, Eric. Ergotoxin und Adrenalinhyperglykämie	87
Boruttau, H. Beiträge zur Frage: Wie wird pflanzliches Eiweiß der Nahrung im Tierkörper verwertet? II.	96
Boruttau, H. Über das Verhalten von Ergänzungsnährstoffen. I. .	103
Buchner, Eduard und Siegfried Skraup. Extraktionsversuche mit verschiedenen Trockenhefen	107
Buchner, Eduard und Siegfried Skraup. Wirkung von Toluol auf die Gärungsvorgänge	134
Asher, Leon. Beiträge zur Physiologie der Drüsen. XXXI. Marcel Dubois, Über das Zusammenwirken von Milz, Schilddrüse und Knochenmark	141

82
86/17
181

443340

Kjöllnerfeldt, Marcus. Untersuchungen über die Permeabilität der Zellen.	
VII. Untersuchungen über die Resorption des Eiweißes und einiger seiner Abbauprodukte in der Bauchhöhle des Kaninchens . . .	188
Helwig, Dr. Eine neue Methode zur Prüfung der Phagoeytose . . .	226
Hárl, Paul. Beiträge zur Lichtabsorption des Oxyhämoglobins . . .	229
Hasselbalch, K. A. Wasserstoffzahl und Sauerstoffbindung des Blutes	282
Herzfeld, E. und E. Klinger. Studien zur Chemie und Physiologie der Blutgerinnung. III	289
Stoklasa, Julius. Die physiologische Bedeutung des Kaliums in der Pflanze. (Erwiderung auf die Mitteilung Th. Weevers)	310
Joschimowitz, Marianne. Ein neues Reagens auf Phloroglucin, Catechin und ihre Derivate, sowie über die Verbreitung derselben im Pflanzenreiche	324
Bokorny, Th. Weitere Versuche über die Trockensubstanzvermehrung der Hefe unter Anwendung von Harnstoff als Stickstoffquelle	359
Djenab, Kemal und Carl Neuberg. Über die Saccharophosphatase der Hefen und die Vergärung der Rohrzuckerphosphorsäure	391
Autorenverzeichnis	412

Die Oberflächenspannung von stereoisomeren Verbindungen.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

L. Berczeller.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Budapest.
Direktor: F. Tangl.)

(Eingegangen am 12. März 1917.)

In ihren chemischen Eigenschaften, und — von der entgegengesetzten Drehung abgesehen — auch in den physikalischen, gleichen die optischen Antipoden einander vollkommen; hingegen weisen sie in ihren physiologischen Eigenschaften in vielen Fällen ziemlich große Unterschiede auf. Da ich in sehr vielen Fällen nachweisen konnte, daß physiologische Wirkung und Oberflächenspannungserniedrigung der Arzneimittel sich parallel verändern, lag es für mich nahe, zu untersuchen, ob die Oberflächenspannung der wässrigen Lösungen von optischen Antipoden eine gleiche ist, oder — wie in vielen Fällen die physiologische Wirkung — eine verschiedene. Ich habe zu meinen Versuchen wässrige Lösungen gewählt, weil diese eben ein größeres physiologisches Interesse bieten, und weil die Veränderung der Oberflächenspannung in wässrigen Lösungen eine viel größere ist, als wenn andere Lösungsmittel verwendet werden. Die Oberflächenspannung der Lösungen wurde mit dem Traubeschen Stalagmometer bei Zimmertemperatur gemessen. Die benutzten Substanzen wurden von Schuchardt bezogen und in einigen Versuchen in der weiter unten angegebenen Weise gereinigt. Zunächst sollen die mit den nicht gereinigten Präparaten angestellten Versuche erwähnt werden.

I. Asparaginsäure.

Es wurden die gesättigten Lösungen der inaktiven und Links-Asparaginsäure untersucht.

Tropfenzahl d. gesättigt. Lösung v. inaktiver Asparaginsäure 44,4
 " " " " " Links- " 43,6

Die Tropfenzahl des destillierten Wassers betrug hier, wie in allen übrigen Versuchen 93,8.

Also wird die Oberflächenspannung des Wassers kaum beeinflusst, und es besteht auch kein nennenswerter Unterschied zwischen den Antipoden.

II. Camphen.

Tropfenz. d. gesätt. wässerigen Lösung von Rechts-Camphen 45,0
 " " " " " " Links- " 45,2

Auch in diesem Falle finden wir nur eine minimale Erniedrigung der Oberflächenspannung; und die optischen Antipoden verhalten sich ebenfalls gleich.

III. Carvoxim.

Auch in diesem Falle wurden die gesättigten wässerigen Lösungen verglichen; u. z. wurden zu Parallelversuchen zwei von derselben Substanz frisch bereitete Lösungen verwendet und mit I und II bezeichnet. (Diese Art der Bezeichnung gilt auch für alle übrigen Versuche.) Zur Herstellung der Lösung wurde möglichst wenig Substanz zum Wasser gesetzt, um die Wirkung der Verunreinigungen möglichst herabzusetzen.

	I	II
Tropfenzahl der Rechts-Carvoxim-Lösung	51,4	51,4
" " Links- " "	49,0	49,0

Hier besteht also eine ziemlich große Differenz zwischen den Oberflächenspannungen der Antipoden.

IV. Acidum phenylglycolicum, Mandelsäure.

Es wurde die inaktive Säure und die Links-Säure, beide in 2⁰/₀igen Lösungen, untersucht.

Tabelle I.
Acidum phenylglycolicum.

	Tropfenzahl der Lösungen		
	A inaktiv	B links	Differenz B-A
5 ccm 2% Säurelösung	50,6	58,2	7,6
+ 1 ccm dest. Wass.	49,6	56,2	6,6
+ 2 " " "	(48,6) ¹⁾	55,0	6,4
+ 3 " " "	47,6	53,6	6,0
+ 5 " " "	46,8	52,0	5,2
+ 10 " " "	46,0	49,2	3,2
+ 15 " " "		47,5	

Hier sind die Differenzen noch erheblich größer als in den vorangehenden Versuchen. Man muß die links-Säure ungefähr auf das Dreifache verdünnen, um dieselbe Oberflächenspannungserniedrigung zu erhalten wie bei der inaktiven Säure. Es ist auch bemerkenswert, daß, wenn man die beiden Lösungen verdünnt, die Differenz zwischen den Tropfenzahlen absolut genommen, immer kleiner wird. (Auf diese Erscheinung werde ich noch zurückkommen.)

V. Campheroxim.

Untersucht wurden die gesättigten wässrigen Lösungen des links- und rechts-Campheroxims.

	I	II
Tropfenzahl des Rechts-Campheroxims	60,0	60,2
" " Links-	59,3	59,4

Die Erniedrigung der Oberflächenspannung ist größer als bei Mandelsäure, die Differenz zwischen den Antipoden geringer.

VI. Cocainum hydrochloricum.

Es wurde das gewöhnliche (Links-)Cocain und das Rechts-Cocain untersucht, u. z. sowohl in neutralen Lösungen, wie auch nach Zusatz von Lauge; denn es wird die Oberflächenspannung dieser Lösungen durch Zusatz von Lauge erniedrigt.

In den 2% igen neutralen Lösungen ist die Oberflächenspannung der Rechts-Cocainlösung kleiner als die der Links-Cocainlösung. Außerdem ist bemerkenswert, daß mit zuneh-

¹⁾ Der in () gesetzte Wert ist durch Interpolation erhalten.

mender Laugenkonzentration die Erniedrigung der Oberflächenspannung zusehends größer wird.

Tabelle II.

	Links-Cocain		Rechts-Cocain	
	Tropfen- zahl	Differenz d. Tropf.-Zahl	Tropfen- zahl	Differenz d. Tropf.-Zahl
5 ccm 2% Lösung	47,0		49,8	
+ 0,1 ccm $\frac{2}{5}$ -KOH	51,4	4,4	53,2	4,4
+ 0,3 " " "	57,2	10,2	57,4	8,6
+ 0,6 " " "	63,1	16,1	63,6	13,8
+ 1,0 " " "	66,6	19,6 ¹⁾	67,2	17,4 ¹⁾
B.				
5 ccm 0,2% Lösung	45,2		45,4	
+ 0,1 ccm $\frac{2}{5}$ -KOH	49,8	4,6	49,6	4,2
+ 0,3 " " "	56,4	11,2	56,6	11,2
+ 0,6 " " "	61,4	16,2	60,8	15,4
+ 1,0 " " "	61,4	16,2	60,4	15,4
C.				
5 ccm 0,05% Lösung	44,6		44,6	
+ 0,1 ccm $\frac{2}{5}$ -KOH	48,8	4,2	49,4	4,8
+ 0,3 " " "	51,4	6,8	50,0	5,4
+ 0,6 " " "	51,4	6,8	50,9	5,4

VII. Limonen.

Es wurden die gesättigten Lösungen von Rechts- und Links-Limonen untersucht.

	I	II
Tropfenzahl der Lösung von Rechts-Limonen	63,4	64,2
" " " " Links- "	56,4	57,5

Es besteht hier eine ziemlich große Differenz zwischen den Oberflächenspannungen der beiden optischen Antipoden, die nur noch von den Mandelsäuren übertroffen wird. Das Verhalten der beiden Limonene ist aber schon deswegen interessanter, weil es sich hier tatsächlich um optische Antipoden handelt, die in ihren sonstigen Eigenschaften einander durchaus gleichen, während bei den Mandelsäuren eine optisch aktive und die inaktive Form verglichen wurden, die auch verschiedene Schmelzpunkte haben.

¹⁾ Beide Lösungen sind trüb, doch das Links-Cocain viel trüber.

VIII. Pinen

wurde unter denselben Bedingungen wie Limonen geprüft.

	I	II
Tropfenzahl der Lösung von Rechts-Pinen	51,4	51,5
" " " " Links	59,3	59,6

Es besteht demnach ein bedeutender Unterschied in der Wirkung der Antipoden auf die Oberflächenspannungen, u. z. erwies sich recht interessanterweise Links-Pinen wirksamer, während es beim Limonen umgekehrt die Rechts-Verbindung war.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß die Oberflächenspannung der optischen Antipoden in vielen Fällen nicht nur nicht gleich ist, sondern sehr verschieden sein kann. Man könnte gegen diese Versuche einwenden, daß die Differenzen durch Verunreinigungen der Substanzen hervorgerufen wurden, was wohl immerhin denkbar wäre in den Fällen, wo es sich bloß um kleine Differenzen handelt, jedoch kaum denkbar für die großen Differenzen bei der Mandelsäure, Pinen und Limonen. Um aber diese Einwände ganz zu entkräften, habe ich je 1 ccm von beiden Antipoden (des Limonen und Pinen) wiederholt mit 10 ccm destilliertem Wasser geschüttelt, die Lösungen zentrifugiert, das Wasser abpipettiert, die Oberflächenspannungen des Waschwassers gemessen und dann das Waschen so oft wiederholt, bis die Oberflächenspannung als konstant befunden wurde. Dadurch habe ich alle Verunreinigungen ausschließen können.

Tabelle III.

Wie oft wurde mit 10 ccm destilliertem Wasser geschüttelt und dann zentrifugiert?	Tropfenzahl der Lösungen			
	Pinen		Limonen	
	rechts	links	rechts	links
1 und 2	51,4	63,4	66,4	59,4
3	50,2	61,4	64,4	56,6
4	48,6	60,4	63,4	56,4
5	48,6	59,6	63,2	56,1
6	48,2	59,6	63,0	55,4
7	48,6	59,6	63,4	55,4

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, werden die Differenzen zwischen den optischen Antipoden nach Entfernung der Ver-

unreinigungen nicht geringer, ja sogar größer. Die erniedrigende Wirkung des Links-Pinens ist mehr als dreimal so groß als die des Rechts-Pinens; die des Rechts-Limonens fast zweimal so groß als die des Links-Limonens.

In der folgenden Tabelle sind noch einige Werte der Oberflächenspannungen dieser Substanzen für verschiedene Konzentrationen angegeben.

Tabelle IV.

	Tropfenzahl der Lösungen			
	gereinigt		nicht gereinigt	
	rechts	links	rechts	links
5 ccm Lösung	48,4	60,2	51,4	62,4
+ 1 ccm dest. Wasser	47,4	57,8	49,8	60,2
+ 2 " " "	—	56,2	—	—
+ 3 " " "	46,6	55,2	48,8	57,8
+ 5 " " "	46,0	53,6	47,0	55,4
+ 10 " " "	45,4	50,6	46,0	52,2
+ 15 " " "	—	48,2	—	—

Wie aus der vorstehenden Tabelle ersichtlich ist, muß man die Lösung des Links-Pinens auf das Vierfache verdünnen, um dieselbe Oberflächenspannung zu erhalten, die eine gesättigte Lösung von Rechts-Pinens besitzt. Andererseits ist es ersichtlich, daß in verdünnteren Lösungen die Wirkung der Verunreinigungen eine viel kleinere ist, die Differenz der optischen der Antipoden dabei eine relativ sehr große.

Tabelle V.

Limonen.

	Tropfenzahl der Lösungen			
	gereinigt		nicht gereinigt	
	rechts	links	rechts	links
5 ccm Lösung	63,4	55,4	66,4	59,2
+ 1 ccm dest. Wasser	60,2	53,4	64,4	57,0
+ 2 " " "	58,8	53,0	—	—
+ 3 " " "	57,6	52,4	61,4	54,8
+ 5 " " "	55,8	49,8	58,8	52,8
+ 10 " " "	52,2	49,2	54,8	50,0
+ 15 " " "	50,6	—	—	—

Man muß die gesättigte Lösung des Rechts-Limonens auf das Doppelte verdünnen, um dieselbe Oberflächenspannung zu

erhalten, welche die gesättigte Lösung des Links-Limonens besitzt.

Nachdem auf diese Weise ganz sichergestellt ist, daß die optischen Antipoden eine verschiedene oberflächenspannungserniedrigende Wirkung besitzen können, wollen wir zum Schluß noch diese Erscheinungen von der quantitativen Seite betrachten, und zwar bei Pinen, Limonen und Mandelsäure, an denen größere Differenzen beobachtet wurden.

In der folgenden Tabelle sind die Differenzen der Tropfenzahlen der optischen Antipoden (bei Mandelsäure wurden Links-Mandelsäure und die inaktive untersucht) in Lösungen verschiedener Konzentration zusammengestellt. Die Differenzen bedeuten:

beim Pinen links-rechts
 beim Limonen rechts-links
 bei der Mandelsäure links-inaktiv.

Tabelle VI.

	Differenz der Tropfenzahlen		
	Pinen	Limonen	Mandelsäure
5 ccm Lösung	11,8	8,0	7,6
+ 1 ccm dest. Wasser	10,4	6,8	6,6
+ 2 " " "	9,2	5,8	6,4
+ 3 " " "	8,6	5,2	6,0
+ 5 " " "	7,6	6,0	5,2
+ 10 " " "	5,2	3,0	3,2

Mit zunehmender Verdünnung nimmt die Differenz der Tropfenzahlen ab, jedoch nicht proportional der Konzentrationsabnahme, indem bei einer Verdünnung der Lösung auf das Doppelte die Differenz nur ungefähr um $\frac{1}{3}$ kleiner wird.

Auf Grund des Zusammenhangs zwischen Tropfenzahl und Oberflächenspannung der wässrigen Lösungen habe ich in der folgenden Tabelle die Abhängigkeit der Oberflächenspannungsdifferenz der beiden Antipoden von der Oberflächenspannungserniedrigung der oberflächenaktiven Substanzen angegeben. Die Zahlen (Δ) bedeuten also in der folgenden Tabelle

$$\Delta = \frac{\sigma_a - \sigma_w}{\sigma_a - \sigma_i}$$

wo σ_a die Tropfenzahl der oberflächenaktiveren Substanz,
 σ_w die Tropfenzahl des destillierten Wassers,
 σ_i die Tropfenzahl der weniger oberflächenaktiven Substanz
bedeutet.

(Diese Zahlen sind selbstverständlich mit ziemlich großen Fehlern belastet, da in ihnen die Versuchsfehler sich häufen.)

Tabelle VII.

	Pinen	Limonen	Mandelsäure
5 cm Lösung	1,3 ₀	2,4 ₂	1,9 ₀
+ 1 ccm dest. Wasser	1,3 ₀	2,4 ₁	1,8 ₈
+ 2 " " "	1,3 ₄	2,5 ₀	1,7 ₅
+ 3 " " "	1,3 ₂	2,6	1,6 ₈
+ 5 " " "	1,2 ₀	2,0	1,6
+ 10 " " "	1,3	2,8	1,7

Bei Pinen und Limonen wurde für alle angegebenen Konzentrationen eine fast konstante Zahl gefunden. Ein minimaler Gang der Konstanten läßt sich allerdings nachweisen, der darauf hinweist, daß in verdünnteren Lösungen die relative Differenz der Oberflächenspannung größer ist als in konzentrierteren Lösungen.

Bei Pinen und Limonen wurde auch die toxische Wirkung auf junge (1—2 cm lange) Fische geprüft, und es konnte nachgewiesen werden, daß die pharmakologische Wirksamkeit sich parallel der Oberflächenspannung der Lösungen verändert; bei Limonen ist die Rechtsverbindung giftiger, bei Pinen umgekehrt die Linksverbindung.

Durch diese Versuche ist erwiesen worden, daß nicht nur die physiologische Wirkung der optischen Antipoden eine verschiedene sein kann, sondern bei gewissen Antipoden auch die Oberflächenspannung ihrer wässerigen Lösungen. Zwischen beiden Erscheinungen besteht ein Parallelismus.

Diese Versuche wurden kurz vor Ausbruch des Krieges begonnen und konnten seitdem nicht fortgesetzt werden. Weitere Untersuchungen in physikalisch-chemischer und auch in physiologischer Richtung behalte ich mir vor.

Die Wirkung der Seifen auf den fermentativen Abbau der Stärke und des Glykogens.

Von

Sigmund Kende.

(Mitteilung aus dem Laboratorium der III. internen Klinik der Universität Budapest und aus dem Central-Laboratorium der städtischen Krankenhäuser in Budapest.)

(Eingegangen am 15. März 1917.)

Versuche, die ich zur Aufklärung der Beziehungen des Pankreas zum Kohlenhydratstoffwechsel unternommen habe, führten zu der Erkenntnis einer spezifischen Eigenschaft der seifenartigen Verbindungen des Organismus, die einerseits vom enzymchemischen Standpunkte aus sehr interessant ist, und andererseits auf Grund meiner Versuche und der diesbezüglichen literarischen Daten geeignet scheint, mehrere, bisher wenig kargelegte Punkte des Kohlenhydratstoffwechsels und zumal die Glykogenfixation in der Leber zu beleuchten. Ob allerdings diese Eigenschaft der Seifen bei der Wirkung des Pankreas auf den Kohlenhydratstoffwechsel eine Rolle spielt, kann ich vorläufig nicht entscheiden.

Zur Mitteilung der Resultate erscheint es mir am zweckmäßigsten, den Weg zu verfolgen, auf welchem ich sie erreicht habe.

I.

Wenn wir von der Auffassung ausgehen, daß das Pankreas an der Regelung des Kohlenhydratstoffwechsels auch durch die Beeinflussung der Glykogenfixation und des Glykogenabbaues teilnimmt, so können wir uns über diese Rolle zwei verschiedene Vorstellungen machen: entweder produziert das Pankreas ein Hormon, das in irgendeiner Weise bei dem Aufbau des Glykogens eine Rolle spielt, oder ein solches, das den Abbau

des Glykogens hemmt. Da diese letztere Annahme einen solchen Vorgang voraussetzt, den wir mit Leichtigkeit künstlich hervorrufen können, und da es eine übliche Methode des Suchens nach Hormonen ist, den Preßsaft des für hormon-erzeugend gehaltenen Organs zu untersuchen, schien es mir möglich, der Klärung dieser Annahme durch in vitro Versuche beizutragen. Ich machte demgemäß die Frage zum Gegenstand der Untersuchung: welchen Einfluß der Pankreaspreßsaft auf den künstlich hervorgerufenen diastatischen Vorgang ausübt, und zum Entscheiden dieser Frage stellte ich Versuche in folgender Anordnung an:

Den Preßsaft habe ich nach dem Buchnerschen¹⁾ Verfahren durch Verreiben des gemahlten Organes mit ausgeglühtem und sorgfältig gewaschenem Quarzsand und durch Pressen unter 200 bis 250 Atmosphären Druck dargestellt, meistens aus Ochsenpankreas, einigemal aus Hammel- und Hundepankreas; die Organe waren natürlich immer ganz frisch. Als Substrat des diastatischen Vorganges gebrauchte ich zur vorläufigen Orientierung Kahlbaumsche lösliche Stärke, gewöhnlich in Form einer 1⁰/₀igen Lösung und zum Hervorrufen des diastatischen Vorganges Mercksche Präparate, meistens auch in 1⁰/₀iger Lösung. Größtenteils wandte ich in den Versuchen Diastase pflanzlicher Herkunft an, einigemal Ptyalin und Pankreasdiastase. In den Resultaten verursachte das keinen Unterschied²⁾. Nun stellte ich in einigen Vorversuchen nach dem Verfahren von Wohlgemuth³⁾ die diastatische Kraft meiner Diastaselösung fest und traf dann folgende Anordnung, um den eventuellen Einfluß des Pankreaspreßsaftes sichtbar zu machen.

Ich gab zu einer Reihe von Eprouvetten, die gleiche Mengen Stärkelösung enthielten, in fallenden Dosen Diastase, so berechnet, daß der „Limes“ auf die mittleren Eprouvetten

¹⁾ Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. 3, 1, 4.

²⁾ Um immer eine gleich starke Diastaselösung zu haben, verfuhr ich folgendermaßen: zum pulverförmigen Präparat fügte ich zuerst sehr wenig Wasser zu und vergrößerte die Quantität des Wassers unter ständigem Rühren langsam, bis ich ein breiartiges Gemisch erhielt; dieses verdünnte ich dann bis auf das nötige Volum und filtrierte endlich durch Watte.

³⁾ Wohlgemuth: Meth. zur quant. Best. d. diast. Ferm. Diese Zeitschr. 9, 1, 1908.

falle, d. h. daß die ersten Epruvetten mehr, die mittleren so viel und die letzten weniger Diastase enthalten sollten, als zum vollständigen Abbau der Stärke nötig wäre. Darauf fügte ich jeder Epruvette einer zweiten ebenso zusammengestellten Reihe noch ein wenig unbehandelten, jeder Epruvette einer solchen dritten Reihe 15 Minuten lang bei 75° erwärmten Pankreaspreßsaft zu; endlich ergänzte ich das Volum überall aufs gleiche und stellte alle drei Reihen auf die erforderliche Zeit in den Thermostaten.

Auf Jodzugabe erhielt ich folgendes Resultat: Während das System ohne Pankreaspreßsaft das Ergebnis der Vorversuche ergab (die Jodreaktion zeigte alle möglichen Übergänge, von den letzten Epruvetten beginnend blaue Farbe der Jodstärke, dann die verschiedenen Rotfarben der Dextrine usw.), enthielten alle Epruvetten der beiden anderen Systeme, zu denen ich Pankreaspreßsaft gefügt hatte, Stärke (blaue Jodreaktion in allen Epruvetten):

Tabelle I.

	1% Stärke	1% Diastase	Wasser	Jodreaktion		1% Stärke	1% Diastase	Pan- kreas- preßsaft	Wasser	Jod- reaktion
1	2 ccm	2,5 ccm	ad 5 ccm	gelb	1	2 ccm	2,5 ccm	0,1 ccm	ad 5 ccm	blau
2	"	2,0 "		"	2	"	2,0 "	"		"
3	"	1,0 "		rot	3	"	1,0 "	"		"
4	"	0,5 "		dunkelrot	4	"	0,5 "	"		"
5	"	0,25 "		violett	5	"	0,25 "	"		"
6	"	0,2 "		blau	6	"	0,2 "	"		"
7	"	0,1 "		"	7	"	0,1 "	"		"

Versuchszeit 1 Stunde.

	1% Stärke	1% Diastase	Erwärmter Pankreaspreßsaft	Wasser	Jodreaktion
1	2 ccm	2,5 ccm	0,1 ccm	ad 5 ccm	blau
2	"	2,0 "	"		"
3	"	1,0 "	"		"
4	"	0,5 "	"		"
5	"	0,25 "	"		"
6	"	0,2 "	"		"
7	"	0,1 "	"		"

Versuchszeit 1 Stunde¹⁾.

¹⁾ Unter Versuchszeit ist hier wie auch bei den anderen Tabellen die Zeit zu verstehen, während der das betreffende System im Thermostaten gehalten wurde.

Versuche mit einigen anderen Preßsäften bei genauer Einhaltung der quantitativen Verhältnisse führten zum gleichen Resultat und zwar immer unabhängig davon, ob der Preßsaft unbehandelt, oder auf 60 bis 70° erwärmt war; nur über der Koagulationstemperatur schien er einen Teil seiner hemmenden Fähigkeit zu verlieren. So schienen die ersten Proben die Annahme, daß der Pankreaspreßsaft irgendeinen den diastatischen Vorgang hemmenden Stoff enthalte, zu bestätigen, gleichzeitig aber auch zu beweisen, daß dieser Stoff thermostabil ist. Zur näheren Prüfung des Wesens der Hemmung mußten verschiedene Variationen der Versuchsbedingungen vorgenommen werden. Zu diesem Zwecke führte ich über 80 dem oben beschriebenen ähnliche Versuche mit Preßsäften verschiedener Herkunft aus. Einigemal habe ich anstatt Organen aus dem Schlachthause (Ochsen-, Hammel-, Schweine-) Hundepankreas angewendet (von durch Verblutung schnell getöteten Tieren), das Preßverfahren bezüglich des Druckes und der Dauer verändert, die Quantität der Diastase, der Stärke und des Preßsaftes, und die Versuchszeit variiert. Das Resultat war immer die vollständige Hemmung des diastatischen Vorganges, diejenigen Versuche ausgenommen, in denen die Menge des angewandten Preßsaftes zu klein war. Bei dieser vielfältigen Wiederholung der Versuche erkannte ich gewisse charakteristische Eigenschaften der Hemmungserscheinung, durch die sie von anderen Enzymhemmungserscheinungen abzuweichen schien. Eine dieser war die folgende:

Die minimale Konzentration, in der der Preßsaft noch hemmend wirkte, war 1:50, 1:80. Jeder andere Enzymparalysator hat natürlich ebenfalls eine untere Grenze, einen Schwellenwert der hemmenden Wirkung. Die gewöhnlichen Enzymparalysatoren wirken, wenn sie in einer den Schwellenwert wenig übertreffenden Konzentration vorhanden sind, immer so, daß sie den Limes ein wenig verschieben. Nehmen wir z. B. die Hydrogen- und Hydroxylionen, die bekanntlich auch diastasehemmend wirken, und mit deren Wirkungsweise diejenige aller Enzymparalysatoren übereinstimmt. Sie wirken in den erwähnten Konzentrationen in folgender Weise:

Tabelle II.

	1% Stärke	1% Diastase	Wasser	Jod- reak- tion		1% Stärke	Diastase	ⁿ / ₁₀ -HCL	Wasser	Jod- reak- tion
1	1,0 ccm	2,0 ccm	ad 3,15 ccm	gelb	1	1 ccm	2,0 ccm	0,15 ccm	ad 3,15 ccm	gelb
2	"	1,5 "		"	2	"	1,5 "	"		gelbrot
3	"	1,0 "		"	3	"	1,0 "	"		rot
4	"	0,5 "		gelbrot	4	"	0,5 "	"		violett
5	"	0,25 "		rot	5	"	0,25 "	"		blau
6	"	0,10 "		violett	6	"	0,1 "	"		"
7	"	0,05 "		blau	7	"	0,05 "	"		"

Versuchszeit 1 Stunde.

	1% Stärke	1% Diastase	Wasser	Jod- reak- tion		1% Stärke	1% Diastase	ⁿ / ₁₀₀ -Nat. hydrox.	Wasser	Jod- reak- tion
1	1 ccm	3 ccm	ad 5 ccm	gelb	1	1 ccm	3 ccm	0,1 ccm	ad 5 ccm	gelbrot
2	"	2 "		"	2	"	2 "	"		rot
3	"	1 "		gelbrot	3	"	1 "	"		dunkel- rot
4	"	0,75 "		rot	4	"	0,75 "	"		violett
5	"	0,5 "		dunkelrot	5	"	0,5 "	"		blau
6	"	0,25 "		violett	6	"	0,25 "	"		"
7	"	0,1 "		blau	7	"	0,1 "	"		"
8	"	0,05 "		"	8	"	0,05 "	"		"

Versuchszeit 1/2 Stunde.

Wie wir sehen, hat das Vorhandensein des hemmenden Stoffes die Grenze des vollständigen Stärkeabbaus um zwei Eprovetten verschoben. Diese Limesverschiebung entspricht dem gewöhnlichen Verhalten bei der Hemmung fermentativer Vorgänge und wird als Zeichen der Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit durch den Enzymparalysator aufgefaßt. Bei dieser Wirkungsweise verursacht die Konzentrationsveränderung des hemmenden Stoffes nur eine quantitative Abweichung der Limesverschiebung nach der einen oder anderen Richtung in der Weise, daß die die Reaktionsgeschwindigkeit herabsetzende Wirkung der Konzentration des Enzymparalysators proportional ist; aber die Äußerung der Wirkung bleibt immer die Limesverschiebung. Die bei der Anwendung des Preßsaftes beobachtete Hemmung zeigte ein von diesem Typ abweichendes Verhalten, das als absolute Hemmung bezeichnet werden kann. Eine Limesverschiebung war nie zu

beobachten, sondern sobald der Preßsaft in eben wirksamen Konzentrationen vorhanden war, trat im ganzen System auch in den an Diastase reichsten Eprouvetten eine absolute Hemmung ein. Dieses eigenartige Verhalten ist aus den folgenden Tabellen gut ersichtlich. Ein Preßsaft z. B. wirkte in einer Konzentration 1:100 noch nicht hemmend:

Tabelle III.

	1% Stärke	1% Diastase	Wasser	Jod- reak- tion		1% Stärke	1% Diastase	Preß- saft	Wasser	Jod- reak- tion	
1	2 ccm	2,5 ccm	ad 5 ccm	gelb	1	2 ccm	2,5 ccm	0,05 ccm	ad 5 ccm	gelb	
2	"	2,0 "		"	2	"	2,0 "	"		"	"
3	"	1,0 "		rot	3	"	1,0 "	"		"	rot
4	"	0,5 "		dunkel- rot	4	"	0,5 "	"		"	dunkel- rot
5	"	0,25 "		violett	5	"	0,25 "	"		"	violett
6	"	0,20 "		blau	6	"	0,20 "	"		"	blau
7	"	0,10 "		"	7	"	0,10 "	"		"	"

Versuchszeit 1 Stunde.

Derselbe Preßsaft in zweifacher Konzentration (1:50) verursachte schon eine vollständige Hemmung:

Tabelle IV.

	1% Stärke	1% Diastase	Wasser	Jod- reak- tion		1% Stärke	1% Diastase	Preß- saft	Wasser	Jod- reak- tion	
1	2 ccm	2,5 ccm	ad 5 ccm	gelb	1	2 ccm	2,5 ccm	0,1 ccm	ad 5 ccm	blau	
2	"	2,0 "		"	2	"	2,0 "	"		"	"
3	"	1,0 "		rot	3	"	1,0 "	"		"	"
4	"	0,5 "		dunkel- rot	4	"	0,5 "	"		"	"
5	"	0,25 "		violett	5	"	0,25 "	"		"	"
6	"	0,20 "		blau	6	"	0,20 "	"		"	"
7	"	0,10 "		"	7	"	0,10 "	"		"	"

Versuchszeit 1 Stunde.

Und in einer Zwischenkonzentration (1:70), bei der Spuren der Hemmung noch zu erkennen waren, gestaltete sich die Wirkung folgendermaßen:

Tabelle V.

	1% Stärke	1% Diastase	Wasser	Jod- reak- tion		1% Stärke	1% Diastase	Wasser	Preß- saft	Jod- reak- tion
1	2 ccm	2,5 ccm	ad 5 ccm	gelb	1	2 ccm	2,5 ccm	ad 5 ccm	0,07 ccm	grün
2	"	2,0 "		"	2	"	2,0 "		"	"
3	"	1,0 "		rot	3	"	1,0 "		"	"
4	"	0,5 "		dunkel- rot	4	"	0,5 "		"	"
5	"	0,25 "		violett	5	"	0,25 "		"	"
6	"	0,20 "		blau	6	"	0,20 "		"	"
7	"	0,10 "		"	7	"	0,10 "		"	"

Versuchszeit 1 Stunde.

Eine Limesverschiebung trat also auch bei dieser Konzentration nicht ein, und das Verhalten aller anderen Preßsäfte bezüglich der Wirkungsweise stimmte mit dem dieses Preßsaftes vollständig überein, d. h. sie verursachten entweder keine oder eine vollständige Hemmung.

Da ich bei der erwähnten Versuchsanordnung nie einen vollständigen Stärkeabbau erreichen konnte, versuchte ich die Anwendung von steigenden Diastasemengen, von dem Gedanken ausgehend, daß bei einer gewissen Menge die Hemmung des Preßsaftes ausgeschaltet werden muß. Dies traf aber nicht zu. Als extreme Beispiele können folgende Systeme dienen:

Tabelle VI.

	1% Stärke	1% Diastase	Preß- saft	Wasser	Jodreaktion		
					nach 24 Stunden	nach 2 × 24 Stdn.	nach 3 × 24 Stdn.
1	50 ccm	0,2 ccm	0	ad 100 ccm	gelb	gelb	gelb
2	50 "	0,2 "	2 ccm	ad 100 ccm	blau	blau	blau
3	50 "	48,0 "	2 "		"	"	"

Bei diesem Versuche habe ich 240mal mehr Diastase angewendet als in dem Kontrollsystem zu einem vollständigen Abbau in 24 Stunden genügte, und dieser riesige Überschuß an Diastase konnte gegen eine Preßsaftkonzentration 1 : 50, trotz der dreifachen Versuchsdauer, keinen vollständigen Stärkeabbau herbeiführen. Die weitere Fortsetzung des Versuches wurde durch die auftretende Fäulnis verhindert, welche die im Preßsaft und in der Diastaselösung immer vorhandenen Bakterien

verursachen, und die auch durch Toluol nicht mehr zu unterdrücken war. Einen andern Versuch, bei dem ich einen 30 Minuten auf 60° erwärmten Preßsaft anwandte, konnte ich 5 × 24 Stunden lang fortsetzen, und obschon hier der Diastaseüberfluß noch größer war, stimmte das Resultat mit dem des anderen Versuches vollständig überein.

Tabelle VII.

	1% Stärke	1% Diastase	Erwärmter Preßsaft	Wasser	Jodreaktion nach				
					24 Std.	2×24 Std.	3×24 Std.	4×24 Std.	5×24 Std.
1	50 ccm	0,2 ccm	0	ad 100 ccm	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
2	50 "	48 "	2 ccm		blau	blau	blau	blau	blau
3	40 "	58 "	2 "		"	"	"	"	"

Schon diese Tatsachen mußten zur Überzeugung führen, daß es sich hier um eine von der gewöhnlichen Diastasehemmung nicht nur quantitativ, sondern auch im Wesen abweichende Erscheinung handelt und daß — wenn die Wirkung der gewöhnlichen Diastaseparalysatoren so aufzufassen ist, daß ihre Anwesenheit die Reaktionsgeschwindigkeit des diastatischen Vorganges ihrer Konzentration proportional herabsetzt — diese Erklärung auf die Erscheinung der Preßsaffhemmung keinesfalls angewendet werden kann. Diese meine Auffassung wurde durch eine weitere Eigentümlichkeit der Hemmungserscheinung bestätigt, die mich gleichzeitig auf die richtige Deutung der Erscheinung führte.

Ich beurteilte den jeweiligen Stand des diastatischen Vorganges in den Hemmungsversuchen nach der Jodreaktion. Schon bei den ersten Versuchen, als ich auf die quantitativen Verhältnisse noch überhaupt nicht achtete, fiel mir auf, daß die Jodstärkereaktion am Ende der Versuche, die ich mit unbehandeltem Preßsaft anstellte, in allen Eprouvetten gleich und zwar von geringer Intensität war, daß weiter Dextrine neben der Stärke nicht einmal in Spuren nachzuweisen waren, obgleich ein Teil der Stärke, nach der schwachen Jodreaktion zu schließen, aus allen Eprouvetten verschwunden war, und endlich, daß der zeitliche Übergang aus dem Anfangsstadium (viel Stärke und intensive Jodreaktion in jeder Eprouvette) — in das sich nicht mehr verändernde Endstadium (eine schwache

Jodstärkereaktion in allen Eprouvetten), sehr schnell eintrat. Als ich später den quantitativen Verhältnissen mehr Aufmerksamkeit schenkte und die Jodreaktion (mit Hilfe entsprechender Verdünnungen) zu quantitativen Schätzungen benützte, vermochte ich genau festzustellen, daß in den mit unbehandeltem Preßsaft ausgeführten Hemmungsversuchen trotz der sogenannten „absoluten Hemmung“ tatsächlich niemals die ganze Stärkemenge, sondern immer nur ein kleiner Teil derselben zurückblieb und daß dieser Teil bei ein und demselben Versuche in allen Eprouvetten des Preßsaftsystems gleich, bei verschiedenen Versuchen aber der Quantität des Preßsaftes proportional ist. Dagegen erwies sich der zurückgebliebene Teil auffallenderweise unabhängig von der Anfangsmenge der Stärke und der Menge der Diastase. Dies machte sich in den Versuchen, bei denen ich den letzten Eprouvetten sehr wenig Diastase zugefügt hatte, in der auffallenden Erscheinung bemerkbar, daß am Ende des Versuches in diesen letzten Eprouvetten des Preßsaftsystems weniger Stärke blieb als in den entsprechenden Eprouvetten des Kontrollsystems (ohne Pankreaspreßsaft), trotzdem die hemmende Wirkung, das Preßsaftsystem im ganzen betrachtet, in vollem Maße wahrzunehmen war. In dem oben ausführlich erörterten Versuche (Tabelle I) z. B. war der Stärkegehalt — nach der Intensität der Jodreaktion beurteilt — in einer jeden Eprouvette des Preßsaftsystems am Ende der Versuche ungefähr $\frac{1}{20}$ der ursprünglichen 2 cg zu schätzen, dagegen blieb in den letzten Eprouvetten 6 und 7 des Kontrollsystems ungefähr $\frac{1}{2}$ bis $\frac{2}{3}$ der Stärke unabgebaut. Dies zeigt zweifellos, daß ein diastatischer Vorgang trotz der durch den Pankreaspreßsaft verursachten starken Hemmung in jeder Eprouvette der Versuchsreihe vor sich gegangen ist, sogar in den letzten Eprouvetten noch intensiver als in den entsprechenden Eprouvetten des Kontrollsystems. Das ist wieder seinerseits mit dem früher Erwähnten zusammengehalten nur so zu deuten, daß der Pankreaspreßsaft seine hemmende Wirkung nicht auf die Diastase, sondern auf die Stärke ausübt. Einen Teil der Stärke — proportional seinem Gehalte an hemmenden Stoffen — auf irgendeine Weise bindend, macht der Preßsaft diesen Teil für die Diastase unzugänglich, die Wirkung der Diastase selbst

aber wird gar nicht oder in ganz unbedeutendem Maße geschwächt. Die ungebundene Stärke wird von der Diastase in normaler Weise abgebaut. Dazu müssen wir uns noch die Tatsache ins Gedächtnis rufen, daß der Pankreaspreßsaft auch selbst eine ziemlich große Menge von Diastase enthält und dadurch ergänzt, erklärt diese Auffassung vollkommen alle bisher beschriebenen Erscheinungen: daß die Hemmung sich nicht in der Verschiebung des Limes äußert, daß sie allen Diastasequantitäten gegenüber absolut ist und endlich, daß unter Umständen der Pankreaspreßsaft den diastatischen Vorgang zu fördern scheint: während in dem erwähnten Beispiel die Diastase menge der letzten Eprouvetten des Kontrollsystems eine so geringe ist, daß sie bloß $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{3}$ Teil der Stärke abbauen kann, ist in dem Preßsaftsystem der durch den Preßsaft bedingte Diastaseüberschuß ausreichend, um die ganze Stärke menge außer dem gebundenen $\frac{1}{20}$ Teil abzubauen.

Für diese Annahme konnte ich bald eine neue Bestätigung finden. Ich untersuchte den Einfluß, den der Pankreaspreßsaft auf den diastatischen Abbau der Dextrine ausübt und fand, daß er denselben überhaupt nicht hemmt, sondern sogar dem eigenen Diastasegehalt entsprechend fördert. Die Anordnung dieser Versuche stimmte völlig mit der der Stärkeversuche überein. Ich hatte zuerst das als „Dextrinum purum“ in den Handel gebrachte Mercksche Präparat von der Stärkeverunreinigung zu befreien. Dieses gereinigte Dextrin gab auch in verdünnter Lösung die rote Jodreaktion, während bei dem ungereinigten Präparat auf geringen Jodzusatze immer blaue Jodreaktion auftrat. Wenn ich zu einer Reihe von Eprouvetten, die gleiche Mengen von einer 1- bis 2⁰/₀igen Dextrinlösung enthielten, in fallenden Mengen Diastase fügte und die Eprouvetten auf kurze Zeit in den Thermostaten stellte, erhielt ich auf Jodzugabe eine Farbenskala von hellgelb bis dunkelrot. Die hemmende Wirkung des Preßsaftes sollte sich nun in einer parallelen Reihe entweder in der Verschiebung der Farbenskala, oder wie beim Stärkeabbau, in der Erscheinung zeigen, daß in allen Eprouvetten die rote Farbe des Erythro dextrins erhalten bliebe. Statt dessen aber erhielt ich in allen Eprouvetten ganz hellgelbe Jodreaktionen als Zeichen, daß keine Hemmung vorhanden war, sondern nur die Wirkung der Preß-

•

Wirkung d. Seifen auf d. fermentat. Abbau d. Stärke u. d. Glykogens. 19
 saftdiastase zur Geltung kam. Der Einfluß ein- und desselben
 Preßsaftes auf den Stärke- und Dextrinabbau gestaltete sich
 folgendermaßen:

Tabelle VIII.

	1 % Dex- trin	Dia- stase	Jod- reak- tion		2 % Dex- trin	Dia- stase	Preß- saft	Jod- reak- tion
1	2 ccm	1,0 ccm	gelb	1	2 ccm	1,0 ccm	0,1 ccm	gelb
2	"	0,5 "	gelbrot	2	"	0,5 "	"	"
3	"	0,25 "	hellrot	3	"	0,25 "	"	"
4	"	0,1 "	dunkelrot	4	"	0,1 "	"	"

Versuchszeit 2 Stunden.

	1 % Stärke	Dia- stase	Jod- reak- tion		1 % Stärke	Dia- stase	Preß- saft	Jod- reak- tion
1	1 ccm	1,0 ccm	gelb	1	1 ccm	1,0 ccm	0,1 ccm	blau
2	"	0,5 "	gelbrot	2	"	0,5 "	"	"
3	"	0,25 "	rot	3	"	0,25 "	"	"
4	"	0,1 "	violett	4	"	0,1 "	"	"

Versuchszeit 2 Stunden.

Noch prägnanter war der Unterschied bei den Versuchen, die ich später mit ungereinigtem Dextrin anstellte: aus der Lösung dieses Präparates, die sehr wenig Stärke und verhältnismäßig viel Dextrin enthielt, isolierte gleichsam der Preßsaft die Stärke; aus der viel Dextrin und wenig Stärke enthaltenden Lösung wurde am Ende der Versuche eine schwache Stärkelösung, die kein Dextrin mehr enthielt (anstatt dessen natürlich Zucker) gewonnen:

Tabelle IX.

	Stärkehal- tige 2 % Dextrin- lösung	Dia- stase	Jod- reak- tion		Stärkehal- tige 2 % Dextrin- lösung	Dia- stase	Preß- saft	Jod- reak- tion
1	2 ccm	2,0 ccm	gelb	1	2 ccm	2,0 ccm	0,1 ccm	hellblau
2	"	1,5 "	"	2	"	1,5 "	"	"
3	"	1,0 "	"	3	"	1,0 "	"	"
4	"	0,5 "	gelbrot	4	"	0,5 "	"	"

Versuchszeit 2 Stunden¹⁾.

¹⁾ Den bis hierher reichenden Teil meiner Versuche habe ich auf der 3. internen Klinik der Budapester Universität ausgeführt, die weiteren Versuche machte ich im Zentrallaboratorium der städtischen Krankenhäuser in Budapest.

Nachdem sich die Wirkungsweise des hemmenden Agens des Pankreaspreßsaftes bei näherer Untersuchung als so eigenartig erwiesen hatte, gewann die ursprüngliche Frage: was für eine Wirkung der Pankreaspreßsaft auf den diastatischen Abbau des Glykogens ausübt? — neues Interesse. Es war zu entscheiden, ob der gefundene hemmende Stoff sich zum Glykogen sowie zur Stärke oder wie zum Dextrin verhält. Zur Lösung dieser Frage ist ein — der Wohlgemuthschen Methode ähnliches — qualitatives Verfahren nicht anwendbar, weil die Jodreaktion des Glykogens, abgesehen davon, daß sie in der Farbe mit der des Erythroextrins übereinstimmt, auch schwächer als diese ist (das Glykogen gibt eine entsprechende rote Färbung in viel konzentrierter Lösung als das Dextrin); und endlich, weil das Glykogen zum vollständigen Abbau viel Diastase beansprucht und auch die im System vorhandene größere Diastasemenge die Farbenreaktion stört. Zur quantitativen Verfolgung der Vorgänge beim Glykogenabbau mußte ich mit Hinsicht auf alle Umstände, statt der scheinbar einfacheren Zuckerbestimmungen, die umständlicheren Glykogenbestimmungen wählen, die ich dann nach dem Pflügerschen Verfahren¹⁾ ausführte. Zuerst mußte ich die zeitlichen und quantitativen Verhältnisse des Glykogenabbaus durch Diastase feststellen. Es war schon bei den qualitativen Proben zu sehen, daß alle mir zur Verfügung stehenden Diastasepräparate das Glykogen, sowohl das von mir bereitete als auch das Mercksche, ziemlich langsam abbauen (auch Diastasen tierischer Herkunft wirkten nicht viel schneller als die gewöhnlich angewandte pflanzliche Diastase); deshalb verwendete ich in den quantitativen Versuchen relativ verdünnte Lösungen vom Glykogen und größere Diastasemengen; endgültig maßgebend war mir folgender Versuch: zu 50 ccm 4⁰/₁₀₀ iger Glykogenlösung gab ich 50 ccm 4⁰/₁₀₀ ige Diastase und stellte die Mischung in den Thermostaten. Nach 24, 48, 56 und 64 Stunden nahm ich je 25 ccm ab und unterwarf diese Portionen dem Pflügerschen Verfahren. Die endlich gewonnenen Niederschläge löste ich in 10 ccm Wasser, invertierte und prüfte die Flüssigkeit auf Zucker. Das erste System (24 Stunden) enthielt Zucker in gut nachweisbarer

¹⁾ Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. 2, 164.

Menge, das zweite (48 Stunden) in kaum nachweisbaren Spuren, das dritte und vierte überhaupt nicht. Der Vorversuch ergab also, daß die angewandte Diastase die gleiche Menge Glykogen in 48 Stunden abbaut.

Nach der Direktive dieser Angaben stellte ich fünf Versuche mit Pankreaspreßsaft an, und das Resultat derselben zeigte übereinstimmend, daß der Pankreaspreßsaft auch den Abbau des Glykogens hemmt. Die kleine Anzahl der Versuche hielt ich für ausreichend, weil es eigentlich nur darauf ankam, ob die Hemmung sich auch auf den Glykogenabbau erstreckt, denn wegen des Parallelismus zwischen Glykogen und Stärke schien es mir überflüssig, die Einzelheiten der Hemmungserscheinung mit der umständlichen Methode der Glykogenversuche zu studieren. Zur Tabelle der Resultate füge ich nur die Bemerkung hinzu, daß ich hier deshalb viel mehr Preßsaft gebrauchen mußte als bei den Stärkeversuchen, weil die Methode, mit der ich arbeitete, nicht genug empfindlich war, um Spuren von Glykogen nachzuweisen. Von den fünf Versuchen führte ich je zwei mit ein und demselben Preßsaft und in ein und derselben Zeit aus, so daß die Daten auf drei Gruppen entfallen:

Tabelle X.

	Glykogen	Diastase	Preßsaft	Wasser	Versuchszeit	Am Ende des Versuchs zurückgebliebenes Glykogen	Bemerkung
I	20 cg	20 cg	32 cem	ad 50 cem	} 51 St.	9,5 cg	Die Bestimmung des aus Glykogen gewonnenen Zuckers geschah nur durch Polarisation.
	"	"	13 "			6,8 "	
	"	"	0 "			0 "	
II	"	"	30 "	ad 50 cem	} 62 St.	12,8 "	Mittelwerte aus Polarisation und Reduktion. In dem III. Versuche gebrauchte ich anstatt pflanzlicher Diastase Ptyalin.
	"	"	20 "			8,5 "	
	"	"	0 "			0 "	
III	"	"	30 "	ad 50 cem	} 48 St.	9,08 "	
	"	"	0 "			0 "	

Diesen ersten Teil meiner Untersuchungen schloß ich damit ab, daß ich einen Vergleich hinsichtlich des Stärkeabbaues zwischen dem Pankreaspreßsaft und Preßsäften anderer Organe machte. Es war ein naheliegender Gedanke, daß Preß-

säfte aller Organe den gefundenen hemmenden Stoff enthalten, oder daß er vielleicht ein Bestandteil aller physiologischen Flüssigkeiten mit größerem Eiweißgehalt ist. Zur Entscheidung dieser Frage machte ich mit Blutserum, mit nativem Eiereiweiß und mit Muskel-, Schilddrüsen-, Nebennieren- und Leberpreßsaft Versuche, durch die klargestellt wurde, daß Blutserum und Eiereiweiß die beim Pankreaspreßsaft gefundene Hemmung überhaupt nicht, die Organpreßsäfte dagegen wohl ergeben, aber unregelmäßig und im allgemeinen auch schwächer als der des Pankreas.

Mit Muskelpreßsaft z. B. erhielt ich bei Stärkeversuchen nie eine Hemmung, obschon ich ihn auch in viel größeren Quantitäten als den Pankreaspreßsaft anwandte; in einem Glykogenversuch jedoch war eine minimale hemmende Wirkung nachweisbar; aus 20 cg Glykogen hielten 50 ccm Muskelpreßsaft 2,5 cg zurück (die Umstände waren die gleichen wie diejenigen der in der Tabelle X aufgezeichneten Glykogenversuche); von den Thyreoideapreßsäften hemmten einige den Stärkeabbau, aber auch nur dann, wenn ich von ihnen eine viel größere Menge anwandte als gewöhnlich von Pankreaspreßsaft, andere hemmten auch in diesem Falle nicht. Folgerichtig beobachtete ich nur bei dem Leber- und Nebennierenpreßsaft die hemmende Wirkung, aber auch bei diesen in viel kleinerem Maße als bei dem Pankreaspreßsaft.

Diese Beobachtungen, die entschieden auf eine gewisse Sonderstellung des Pankreas hinwiesen (wenn sie auch die Annahme, daß dieser Stoff ein während der Bearbeitung des Organs entstandenes Kunstprodukt ist, nicht ausschließen) unterstützten jedenfalls die Auffassung, daß dieser Stoff eine physiologische Bedeutung haben könnte. Die Sonderstellung des Pankreas hinsichtlich dieses Stoffes stützte also die Ansicht, zu der auch die Sonderstellung desselben unter den bisher bekannten Enzymparalysatoren geführt hatte, daß ich wahrscheinlich ein hormonartiges Produkt des Pankreas in der Hand habe¹⁾.

¹⁾ Ich will hier hervorheben, daß ich in Oppenheimers Werk: „Die Fermente und ihre Wirkungen“, das auf diesem Gebiete als vollständig anerkannt ist, weder bezüglich der Diastase, noch anderer Fermente eine konkrete Angabe von einer ähnlichen Hemmungserscheinung

Alles in allem war die gefundene Erscheinung ein Grund, in vivo Versuche aufzunehmen.

II.

Die Erfolglosigkeit der Versuche, den Mangel der innersekretorischen Funktion des Pankreas bei Tieren durch die parenterale Einfuhr von Pankreasgewebe zu paralysieren, veranlaßte mich, wenigstens die teilweise Isolierung des gefundenen hemmenden Stoffes zu unternehmen, um für spätere physiologische Versuche ein möglichst einheitliches von Nebensubstanzen freies Material zu gewinnen. Daß es mir gelingen werde, in dieser Richtung etwas zu erreichen, ersah ich aus dem Umstande, daß ich im Besitze einer leicht und schnell erkennbaren Eigenschaft des gesuchten hypothetischen Hormons, nämlich der hemmenden Wirkung auf Stärkeabbau war. Dadurch konnte ich nämlich bei beliebiger Behandlung des Preßsaftes (Ausziehen, Ausfällen) stets gleich entscheiden, wo der gesuchte Stoff bzw. der größere Teil desselben sich befindet, ob im Niederschlage, oder im Filtrat, in der Auszugsflüssigkeit oder in dem zurückgebliebenen Teile, und ich konnte die Isolierung mit der entsprechenden Portion fortsetzen; oder aber im anderen Falle konnte ich feststellen, daß der gesuchte Stoff in keiner Portion vorhanden, daß also das betreffende Verfahren zur Isolierung nicht verwendbar ist. Und während mir dies einerseits die Gewähr bot, daß ich bei der Isolierung den richtigen Weg nicht verfehlen werde, lernte ich andererseits schon durch die bisherigen Versuche einige Eigenschaften des gesuchten Stoffes kennen, die geeignet waren, mein Suchen bald auf die richtige Spur zu führen.

Eine solche Eigenschaft war schon die, daß der Stoff thermostabil, ja sogar koktostabil ist. Er widersteht selbst längerem Kochen. Anfangs schien er zwar nur diejenigen Temperaturen zu vertragen, bei denen Eiweiß nicht gerinnt, später aber fand ich, daß er sogar auch im gekochten Preßsaft deutlich nachweisbar ist, wenn man dafür Sorge trägt, die Probe in Gegen-

—
fand, nämlich daß ein Enzymparalysator nicht auf das Enzym, sondern auf dessen Substrat einwirkt; eine solche wird nur als eine theoretische Möglichkeit dort erwähnt, wo es sich um den Mechanismus der Fermenthemmung handelt. Oppenheimer, „Die Fermente“ 1, 64, 1913.

wart der geronnenen Eiweißkörper anzustellen (Schütteln, Suspendieren der Flocken). Der dadurch in den Vordergrund tretenden Folgerung, daß es sich hier um einen Eiweißstoff handele, widersprachen mehrere Umstände, auf Grund deren ich die Erscheinung deuten mußte, daß der hemmende Stoff durch den Eiweißniederschlag nur adsorbiert wird, aber selbst kein Eiweißstoff ist. Für diese Schlußfolgerung sprach außer der Thermostabilität der Umstand, daß ich durch Modifikationen des Preßverfahrens im Eiweißgehalt wesentlich voneinander abweichende Preßsäfte gewinnen konnte, bei denen sich die hemmende Wirkung als von dem Eiweißgehalt ganz unabhängig erwies; einmal war z. B. die hemmende Wirkung eines Preßsäftes mit 1,5% Eiweiß größer als die eines mit 9,5% Eiweiß. Und endlich fand ich noch einen Umstand der erwähnten Annahme — es sei ein Eiweißstoff — widersprechend: ich konnte nämlich in den gewöhnlichen Pankreaspräparaten des Handels (Pankreatin, Pankreon usw.), die außer den Fermenten gewöhnlich auch einen großen Teil der Organeiweißstoffe enthalten, niemals eine Spur des hemmenden Stoffes nachweisen. Diese Beobachtung trachtete ich dann auch in anderer Richtung zu verwerten; die Bereitungsweise dieser Präparate, bei denen die Entfernung der Organlipide eine wichtige Rolle spielt, veranlaßte mich, beim Suchen des zu isolierenden Stoffes in erster Reihe mit Lipoidlösungsmitteln zu verfahren und den hemmenden Stoff im Extrakte zu suchen. Noch eine Eigenschaft des hemmenden Stoffes hatte ich beim Studium seiner Wirkungsweise kennen gelernt, der später in den Isolierungsversuchen eine wichtige Rolle zuteil wurde; nämlich die überaus starke Empfindlichkeit gegen Säuren. Wenn ich dem Preßsaft etwas Säure zusetzte, verlor er seine Fähigkeit zu hemmen, aber beim Zusatz der äquivalenten Menge Lauge gewann er sie wieder.

Bei den systematischen Isolierungsversuchen wandte ich die Stärkeproben an Stelle der im ersten Teile besprochenen Reihe in einer vereinfachten Form an. Um von einem bei der Isolierung gewonnenen Niederschlage oder einer Flüssigkeit zu erfahren, ob sie den hemmenden Stoff enthalten, nahm ich eine kleine Portion derselben, fügte gleiche Mengen 1% Stärke- und 1% Diastaselösung hinzu, stellte dann die Mischung in den

Thermostaten und nahm nach 40 bis 60 Minuten die Prüfung auf Stärke vor. Erhielt ich diesmal eine positive Reaktion, so konnte ich daraus mit völliger Sicherheit auf das Vorhandensein des hemmenden Stoffes folgern. Mit der Direktive dieser einfachen Reaktion konnte ich recht schnell in der Isolierung fortschreiten.

Die Vermutung, daß es sich hier um ein Lipoid handle, erwies sich als begründet: der hemmende Stoff löste sich in den Lipoidlösungsmitteln. Nach Feststellung dieser wichtigen, physikalischen Eigenschaft gelang es mir bald, den hemmenden Stoff auch chemisch zu definieren. Einerseits die Tatsache, daß er sich in Alkohol besser als in andern Lipoidlösungsmitteln löste, andererseits die Erfahrung, daß die Ansäuerung und Alkalisierung nicht nur die Wirkungsfähigkeit der den hemmenden Stoff enthaltenden Auszüge aufhob bzw. wiederherstellte, sondern auch die Löslichkeitsverhältnisse des gesuchten Stoffes veränderte und zwar so, daß die Alkalisierung ihn wasserlöslich, das Ansäuern wasserunlöslich machte, — diese beiden Beobachtungen lenkten meine Aufmerksamkeit darauf, daß es sich hier vielleicht um seifenartige Verbindungen handle. Von den bekannten Lipoiden des Organismus haben nämlich nur die Seifen die erwähnten Eigenschaften: sie sind in Alkohol besser löslich als in andern Lipoidlösungsmitteln, und außerdem sind die höheren Fettsäuren in Wasser fast unlöslich, ihre Seifen dagegen mehr oder weniger gut löslich. Diese Wahrscheinlichkeit wurde durch folgende Versuche zur Sicherheit:

Erst machte ich mit meinen bei der Isolierung gewonnenen reinsten und stark hemmenden Extrakten Fettsäure- und Seifenreaktionen: mit positivem Ergebnisse. Dann stellte ich einerseits fest, daß ich die hemmende Fähigkeit auf das Maximum steigern kann, wenn ich Alkali bis zur vollständigen Bindung der Fettsäuren zugebe; andererseits machte ich mit solchen mit Alkali gesättigten Extrakten nach Entfernung der neutralen Fette Hemmungsversuche, und diese zeigten, daß die Entfernung der Neutralfette die hemmende Fähigkeit nicht schwächt, und endlich untersuchte ich Seifen einiger höherer Fettsäuren (chemisch reine Mercksche und Kahlbaumsche Präparate) darauf, ob sie unter gleichen Umständen die gleiche Wirkung wie der

Pankreaspreßsaft und die aus ihm isolierten Stoffe auf den Stärkeabbau haben. Ich begnügte mich natürlich nicht damit, nur im allgemeinen festzustellen, daß die Seifen der höheren Fettsäuren den diastatischen Abbau hindern, sondern um zweifellos nachzuweisen, daß die bei den Preßsaftversuchen beobachteten Erscheinungen tatsächlich durch Seifen verursacht wurden, wiederholte ich alle diejenigen Versuche, die die hemmende Wirkung so eigenartig hervortreten ließen. Ich fand in jeder Beziehung eine vollständige Übereinstimmung:

1. Die hemmende Wirkung der Seifen bei dem Stärkeabbau war genau dieselbe wie die des Preßsaftes, d. h. ihre Wirkung richtete sich nicht auf die Diastase, sondern auf die Stärke. Verdünnte Seifenlösungen verursachten ebenso wie der Pankreaspreßsaft keine Limesverschiebung, sondern eine absolute Hemmung, auch schon in der kleinsten, wirksamsten Konzentration; die Menge der unabgebauten Stärke erwies sich der der angewandten Seife proportional und außerdem als unabhängig von der Diastase, wenn die letzte im Überschuß vorhanden war. Bei konzentrierteren Seifenlösungen trat natürlich auch der Hydroxylionen-Gehalt der Seifenlösungen in Erscheinung. Aber bei niedrigeren Konzentrationen war die Abweichung der Wirkungsweise von dem gewöhnlichen Typ der Hemmung unverkennbar. Sehr sinnfällig läßt dies jener Versuch hervortreten, bei dem ich als Kontrollsystem eine Reihe mit $n/_{100}$ -Natronlauge und zwar in gleicher Zusammenstellung wie die des Laugeversuches in der Tabelle II gebrauchte und das

Tabelle XI.

	1% Stärke	1% Diastase	$n/_{100}$ - NaOH- Lösung	Wasser	Jod- reaktion		Stärke	Diastase	$n/_{100}$ -Na oleinic.	Wasser	Jod- reaktion
1	1 ccm	3 ccm	0,1 ccm		gelb	1	1 ccm	3 ccm	0,1 ccm		blau
2	"	2 "	"		dunkel-	2	"	2 "	"		"
3	"	1 "	"	ad 5 ccm	rot	3	"	1 "	"	ad 5 ccm	"
4	"	0,75 "	"		violett	4	"	0,75 "	"		"
5	"	0,50 "	"		blau	5	"	0,50 "	"		"
6	"	0,25 "	"		"	6	"	0,25 "	"		"
7	"	0,10 "	"		"	7	"	0,10 "	"		"
8	"	0,05 "	"		"	8	"	0,05 "	"		"

Versuchszeit $\frac{1}{2}$ Stunde.

Seifensystem gleichfalls $\frac{1}{100}$ -Seifenlösung (hergestellt aus derselben $\frac{1}{100}$ -NaOH-Lösung durch Zusatz einer äquivalenten Menge von Oleinsäure) enthielt.

Auch noch ein Viertel dieser Seifenlösung verursachte in diesem System selbst bei dreifacher Versuchsdauer eine vollständige Hemmung:

Tabelle XII.

	1% Stärke	1% Diastase	$\frac{1}{100}$ -Na oleinic.-Lösung	Wasser	Jodreaktion
1	1 ccm	3 ccm	0,025 ccm	ad 5 ccm	blau
2	"	2 "	"		"
3	"	1 "	"		"
4	"	0,75 "	"		"

Versuchszeit $1\frac{1}{2}$ Stunde.

Die Jodreaktion in jeder Eprouvette ist hell, aber deutlich blau.

2. Auch die Intensität der hemmenden Wirkung war, mit dem ungefähren Seifengehalt der Organe verglichen, hinreichend, um die bei den Preßsaftversuchen gefundenen Erscheinungen zu erklären. Die hemmende Wirkung war noch in einer Verdünnung 1:1,000000 nachweisbar:

Tabelle XIII.

	1% Stärke	1% Diastase	$\frac{1}{100}$ Na oleinic.-Lösung	Wasser	Jodreaktion
1	1 ccm	1 ccm	0,1 ccm	ad 10 ccm	blau
2	"	"	0,05 "		"
3	"	"	0,04 "		"
4	"	"	0,03 "		"
5	"	"	0,02 "		"
6	"	"	0,01 "		"
7	"	"	0 "		gelb

Versuchszeit 2 Stunden.

Die Seifenverdünnung in der 6. Eprouvette ist 1:1,000000.

3. Den Dextrinabbau hemmten die Seifen in kleiner Konzentration durchaus nicht.

4. Der Glykogenabbau dagegen wurde gehemmt. Ich stellte zwei quantitative Glykogenversuche an: bei dem einen hielten 20 cg Seife (Na oleinic.) aus 20 cg Glykogen 15,5 cg, im anderen aus 20 cg 14,5 cg zurück, während in dem Kontrollsystem des ersteren 2,5 cg, in dem des zweiten nur Spuren von Glykogen zurückblieben. Die Versuchsanordnung stimmte

mit den mit Preßsaft durchgeführten Versuchen völlig überein, nur die Flüssigkeitsmengen waren statt 50 ccm 100 ccm. — Die entsprechenden höheren Fettsäuren selbst übten, wie es zu erwarten war, gar keinen Einfluß, weder auf Stärkeabbau, noch auf Glykogenabbau aus. Seifenlösungen mit stark hemmender Wirkung verloren ihre Hemmungsfähigkeit gänzlich, wenn ich ihnen eine ihrem Alkaligehalt äquivalente Menge Säure zufügte.

Auf Grund dieser Tatsachen konnte ich diesen Teil meiner Arbeit als abgeschlossen und als einwandfrei festgestellt erachten, daß die den Stärke- und Glykogenabbau so eigenartig hemmenden Stoffe, die ich zuerst im Pankreas, dann später in kleineren Quantitäten auch in anderen Organen fand, die Seifen der höheren Fettsäuren sind¹⁾.

III.

Es ist selbstverständlich, daß dieses Resultat der Isolierungsversuche die Beurteilung der im ersten Teile gefundenen Tatsachen und damit auch den ursprünglichen Versuchsplan änderte. Ich will nur die wichtigeren, neu entstehenden Fragen erwähnen: ich mußte zuerst die Frage aufwerfen: ob es bei dem jetzigen Stande unserer physiologischen Kenntnisse

¹⁾ Zur Vollständigkeit der chemischen Sicherstellung wäre eigentlich noch genau festzustellen, Seifen welcher Fettsäuren in meinen aus dem Pankreas dargestellten, am stärksten wirkenden Präparaten enthalten sind; statt dessen begnügte ich mich damit, die Seifen der im Organismus meist vorkommenden Fettsäuren auf ihre Hemmungswirkung zu untersuchen. Ich fand, daß die Seifen der unteren Glieder der gesättigten Reihe bis zur Valeriansäure keine Wirkung ausüben, dagegen die der Palmitin- und Stearinsäure und von den ungesättigten die der Oleinsäure — wohl. Auf die dazwischenfallenden, im Organismus seltener und in sehr geringen Mengen vorkommenden Glieder der einwertigen, gesättigten Reihe lenkte ich meine Aufmerksamkeit nicht; gelegentlich stellte ich noch fest, daß die Alkaliverbindungen der Ricinol- und Linolsäure auch eine hemmende Wirkung aufweisen, die der Milchsäure und Oxalsäure dagegen nicht. Auch mit anderen Alkaliseifen stellte ich einige Male Versuche an: die K, H₂N, ja sogar, wenn ich die Flocken suspendierte, auch die Ca-Seifen wirkten positiv.

Obschon ich die Natur der Stärke-Seife-, Glykogen-Seife-Bindung vorläufig nicht zum Gegenstand näherer Untersuchung machte, weil mich dies von meinem eigentlichen Thema zu weit abgelenkt hätte, halte ich es in Verbindung mit dem Letzterwähnten für bemerkenswert, daß ich aus den Erfahrungen mit Ca-Seifen und aus einigen anderen (Veränderung des Brechungsexponenten bei Mischung von Stärke- und Seifenlösungen) den Eindruck gewann, daß es sich hier nicht um eine eigentliche chemische Bindung, sondern um eine Adsorptionsercheinung handelt.

überhaupt möglich wäre, der gefundenen Eigenschaft der Seifen in der physiologischen Glykogenfixierung eine Rolle zuzuschreiben; ob diese Annahme nicht im scharfen Gegensatz zu irgendwelchen unserer bisherigen physiologischen Kenntnisse stände? Dann, wenn sich dies bejahen ließe, die nächste und zugleich wichtigste Frage: ob diese Erscheinung auch wirklich eine physiologische Rolle spielt, oder ob es sich vielleicht nur um eine bloß unter künstlichen Verhältnissen auftretende Erscheinung handelt? Und endlich — wenn auch diese Frage in positivem Sinne beantwortet wird — unserem Ausgangspunkte noch näher tretend: in welchem Verhältnisse steht der Seifengehalt des Organismus zum Pankreas? Kann man die Seifen als inneres Sekret des Pankreas auffassen, oder spielen sie wohl eine physiologische Rolle, jedoch unabhängig vom Pankreas, und war es nur die, durch den großen Lipasegehalt dieses Organs hervorgerufene, postmortale Lipolyse, die es verursachte, daß es in den Hemmungsversuchen an erster Stelle gefunden wurde? Nachdem durch diese Fragestellung solche Stoffe mit Kohlenhydratstoffwechsel-Problemen in Zusammenhang gebracht wurden, mit denen die physiologische Chemie sich schon vielfach beschäftigte, beanspruchte die Beantwortung dieser Fragen zunächst ein eingehendes Studium der Literatur. Ich möchte schon hier darauf hinweisen, daß ich dabei keine derartigen physiologischen und physiologisch-chemischen Daten gefunden habe, die die Möglichkeit, ja selbst die Wahrscheinlichkeit ausschließen, daß die Seifen ihre „in vitro“ beobachtete, glykogenfixierende Eigenschaft auch im Organismus ausüben. Dagegen traf ich auf mehrere Angaben, die mit der hypothetisch-physiologischen Rolle der Seifen im Kohlenhydratstoffwechsel in nähere oder weitere Beziehung zu stellen und gut in Einklang zu bringen sind. Diese Angaben beziehen sich teils auf den relativ hohen Seifen-(Fettsäuren-)Gehalt der Leber, des Muskelgewebes und der Ductus thoracicus-Lymphgeleite, teils auf die Fixierung und den Abbau des Glykogens in der Leber, gleichwie auf den postmortalen Glykogenschwund in derselben: und zwar sind letztere Daten mit unserem Gegenstande dadurch in Zusammenhang zu bringen, daß sie übereinstimmend auf das Bestehen irgendeiner labilen, gegen Säuren sehr empfind-

lichen Glykogenbindung hinweisen. Ich fand außerdem auch solche von sehr verlässlichen Verfassern stammende Daten, die darauf hinweisen, daß die Seifeneinfuhr bei einem pankreaslosen Hunde die Zuckerausscheidung vermindert.

Ich will mich diesmal nicht ausführlich mit der Besprechung aller dieser Angaben befassen, weil sie zur vollständigen Aufklärung unseres Problemes an und für sich nicht ausreichend sind. Wurden doch die Untersuchungen, denen die von mir erwähnten Daten entstammen, zur Aufklärung anderer Fragen unternommen und haben diese mich interessierenden Angaben nur nebenbei geliefert, also ganz selbstverständlich, nicht in solcher Zahl und in solcher Gruppierung, daß aus ihnen eine bestimmte Antwort auf die von mir aufgeworfenen Fragen zu gewinnen wäre. In unserem Laboratorium werden jetzt nach mehreren Richtungen hin Versuche ausgeführt, die die Klarlegung der Rolle der Seifen im Kohlenhydratstoffwechsel bezwecken, und ich beabsichtige, die eben erwähnten diesbezüglichen literarischen Angaben zusammen mit den Resultaten dieser Versuche zu publizieren. Meine bisher feststellbaren Ergebnisse kann ich demgemäß in folgendem zusammenfassen:

1. Die Seifen der höheren Fettsäuren hemmen den diastatischen Abbau der Stärke und des Glykogens. Ihre Wirkungsweise ist von den wirklichen Enzymparalysatoren verschieden, indem sie nicht auf das Enzym, sondern auf das Substrat der Enzymwirkung einwirken: sie bilden mit dem Glykogen, beziehungsweise mit der Stärke eine für die Diastase unangreifbare Verbindung (Adsorptionsbindung?).

2. Diese Eigenartigkeit der Hemmung, die Labilität der Glykogen-Seife-Bindung, die Empfindlichkeit dieser gegen Säuren, der relativ große Seifengehalt des Pankreas und der Leber, weiterhin der Umstand, daß die Seifen diese Wirkung bereits in sehr geringer Konzentration ausüben — legen den Gedanken nahe, daß diese Erscheinung zur Erklärung der physiologischen Glykogenfixierung herangezogen werden könnte.

3. Allem Gesagten zufolge verdient die gefundene Erscheinung eine eingehende, weitere Untersuchung bezüglich ihrer Anwendbarkeit im Kohlenhydratstoffwechsel.

Über *Bacillus paralacticus*.

Von

F. Ducháček, z. Zt. Olmütz.

(Eingegangen am 20. März 1917.)

Metschnikoff hat eine ganze Reihe Tatsachen festgestellt, die darauf hinweisen, daß der Mensch in seinen Gedärmen, namentlich im Dickdarme, eine sehr große Schaar mikroskopischer Feinde unterhält, die unseren Organismus chronisch vergiften, uns im Alter unglücklich machen und unsere Lebensdauer stark verkürzen.

Durch rationelle Ernährungsweise ist es möglich, die Darmflora zu ändern und die Bildung der bekannten aromatischen Darmgifte — Phenol, Indol — die der Eiweißfäulnis ihren Ursprung verdanken, ganz oder fast ganz zu vertilgen und hierdurch das Elend des zu frühen Alterns zu mildern.

Um das gewünschte Ziel zu erreichen, das heißt, um eine gutartige Darmflora bei uns zu entwickeln, müßte man eine genaue Kenntnis von der Beschaffenheit menschlicher intestinaler Bakterien erhalten. Dies ist aber nur zu einem kleinen Teil gelungen, da das Thema zu kompliziert und schwierig ist. Erst vor kurzem hat man angefangen, systematisch die Darmflora der Menschen und der Tiere zu studieren. Trotzdem die Kenntnis der Darmflora und deren Beziehung zum Altern noch lange nicht definitiv ausgearbeitet ist, besitzt die Wissenschaft doch schon manche nützlichen Hinweise für das rationelle Handeln. Die wilde Flora unserer Gedärme mit ihren giftbildenden Bakterien kann bis zu einem gewissen Grade in eine unschädliche umgesetzt werden. Dazu müssen Darmfäulnis erregende Nahrungsstoffe möglichst beschränkt und durch mannigfache vegetabilische ersetzt werden. Außerdem müssen die gutartigen, fäulniswidrigen Bakterien im Kampfe gegen die giftbildenden Darmbakterien ausgenützt werden.

Es ist seit langem bekannt, daß es Völker gibt, die viel von verschiedenen Sauermilchpräparaten (Labe, Kefir, Kumys, Yoghurt, Mazun, Gioddu, Lebenraib) als Nahrung nehmen und dabei sich guter Gesundheit und eines langen, kräftigen Lebens erfreuen. Da diese verschiedenen Milchprodukte viel Milchsäurebakterien enthalten, so ließ sich voraussetzen, daß diese Organismen dadurch nützlich sind, daß sie einen fäulnishemmenden Einfluß im Darne ausüben. Dies war der Grund, daß man angefangen hat, diese Bakterien genauer zu untersuchen und unter ihnen die wirksamsten zu isolieren und weiter zu züchten. Als beste Milchsäurebildner haben sich mikroskopische Stäbchen erwiesen, die in der Dickmilch bulgarischer Provenienz gefunden wurden und denen man deshalb den Namen: *Bacillus bulgaricus* gegeben hat.

Ein Verdienst Metschnikoffs ist es, daß die bulgarische Sauermilch, Yoghurt, allgemein wurde; sie kann ohne Schwierigkeiten auch im Hause bereitet werden unter Anwendung von Yoghurtpräparaten, die seitens verschiedener Firmen in den Handel gebracht werden.

Die günstige Wirkung des Yoghurt im Menschenorganismus wird einerseits der leichten Verdaulichkeit und dem hohen Nährwerte der Milch zugeschrieben, die in Yoghurt übergeführt auch von schädlichen Bakterien befreit wird, andererseits aber dem hohen Milchsäuregehalte, der desinfizierend im Verdauungstrakte wirkt und die Fäulnisprozesse erschwert.

Die gewöhnliche Sauermilch enthält nie über 0,6⁰/₀, Yoghurt dagegen je nach dem Säuerungsgrade 0,8 bis über 2⁰/₀ Milchsäure, die der Verdauungstrakt in dieser Verdünnung noch gut verträgt.

Keine andere Milchsäurebakterie ist imstande, soviel Milchsäure zu bilden. Außergewöhnlich hohe Angaben für die Milchsäuremenge macht R. Weiß¹⁾. Er gibt von seinem *Bacillus fortissimus* an, daß er 6,3, auch 7,0⁰/₀ Milchsäure zu bilden imstande wäre; diese Zahlen geben in Wirklichkeit aber nur die zur Titration verbrauchte Menge des Normalalkali an. Die von dem *Bacillus* produzierte Säuremenge beträgt also

¹⁾ Arb. a. d. Instit. d. techn. Hochsch. Karlsruhe 2, 264, 1902.

auch nicht mehr als sonst gefunden wird, nämlich 0,53⁰/₀ bzw. 0,57⁰/₀.

Man hat nun versucht, diese Bakterien im großen zu züchten und zur Heilung verschiedener Krankheiten des Darmkanals zu benutzen. Die Resultate bei der Behandlung solcher Verdauungsstörungen, deren Ursache man in der Fäulnis des Darminhaltes erblicken konnte, waren so ermunternd, daß die Anwendung der Milchsäurebakterien sich sehr rasch verbreitet hat. Und so erschienen bald im Handel neben den zur Herstellung von Sauermilch verwendeten Yoghurtfermenten auch Medizinalpräparate unter verschiedenen Bezeichnungen. In der Praxis hat sich nach Metschnikoff der Gebrauch der fäulniswidrigen Bakterien im ganzen genommen gut bewährt. Leider werden nur zu oft schlechte Präparate in den Handel gebracht, die entweder keine Milchsäurebacillen oder nur deren Leichen enthalten. Es sind ganz besonders die in der Trockenform (Tabletten, Pulver) verkauften Präparate, die diesen Nachteilen ausgesetzt sind, da sämtliche bekannten Milchsäurebakterien keine trockenfesten Dauerformen erzeugen. Deshalb sind flüssige Kulturen dieser Mikroorganismen entschieden besser.

Die Yoghurtpräparate sind entweder Reinkulturen des Yoghurtbacillus oder Mischkulturen, die neben ihm auch andere Bakterien, zumeist wieder nur Milchsäurebakterien, manchesmal aber auch andere enthalten.

Durch Zugabe der fremden Bakterien werden verschiedene Ziele verfolgt. Die schwachsäuernden Milchsäurebakterien verbessern gewöhnlich den Geschmack und das Aroma des Produktes und unterstützen den Hauptmikroben dadurch, daß sie die Säuerung einleiten, die dann vom *Bacillus bulgaricus* beendet wird. Wird ein Produkt verlangt, dessen Qualität dem balkanischen zunächst liegt, dann sind es gewöhnlich die Mikroben der bulgarischen Sauermilch: *Diplococcus Grigoroff* und *Streptokokkus*. Anstatt derselben beantragte Metschnikoff, namentlich für Medizinalpräparate, eine andere Milchsäurebakterie, u. zw. den *Bacillus paralacticus*. Seine Reinkultur wird nach Metschnikoffs Anleitung von der Gesellschaft „Le Ferment“ in Paris zubereitet und unter dem Namen „Lactobacilline“ entweder pulverförmig, in Pastillen oder als Bouillon-

kultur in den Handel gebracht¹⁾. Nebst diesen erzeugt dieselbe Gesellschaft direkt in gefälligen Porzellanbechern²⁾ von 250 bis 300 ccm Inhalt eine feinschmeckende Sauermilch, die unter der Bezeichnung „Lactobacilline, lait caillé en pot“ in den Geschäftslokalen angeboten wird. Es ist dies eine schwach-sauere, aromatisch schmeckende Sauermilch porzellanartigen Aussehens, das auch nach längerem Aufbewahren unverändert bleibt.

Das frische, täglich dem Laboratorium Metschnikoffs gelieferte Produkt ward mir zum Ausgangspunkte der unten angeführten Untersuchungen, die ich noch vor dem Kriege am Institut Pasteur in Paris, parallel mit *Bacillus bulgaricus* und Efferonschem *Bacillus*, angestellt habe; über den von Efferont³⁾ aus den Medizinalpräparaten des Handels isolierten proteolytischen Mikroben habe ich schon früher an einer anderen Stelle ausführlich berichtet⁴⁾.

Aus dem Lactobacilline isolierte ich mittels bekannter Methoden eine Milchsäurebakterie, die Metschnikoff als „Cocobacille paralactique Tissier“, *Bacillus paralacticus* bezeichnet hat. Es ist dies ein kokkusartiger *Bacillus*, der kaum 1 μ lang ist; auf Agar bildet er bei 40° durchscheinende winzige Kolonien mit glattem Rande, ähnliche auch auf Gelatine, die durch ihn nicht verflüssigt wird. In der Bierwürze wächst er nicht. Die Milch koaguliert er in ganzer Masse gleichmäßig porzellanartig, und das Gerinnsel wird auch nach längerem Aufbewahren (2 Monate) nicht gelöst, denn das Casein wird von der Bakterie überhaupt nicht angegriffen.

¹⁾ Einen anderen Zweck verfolgt die von Metschnikoff beantragte Anwendung des Glykobakter *peptolyticus* (Intestibakter), der durch Wollmann aus dem Verdauungstrakte des Hundes isoliert wurde. Diese Bakterie (siehe E. Klebs, *Pharm. Zeitg.* 58, 35, 1913) kann sich im Dickdarme akklimatisieren und erzeugt dann aus den Speiseresten Zucker, den unumgänglich notwendigen Nährstoff des Yoghurtbacillus, der in seiner Wirkung gerade an jener Stelle unterstützt wird, wo die schädlichen Bakterien sich am meisten vermehren.

²⁾ In ähnlichen Bechern wird in Yoghurttrinkhallen zu Sofia Yoghurt serviert.

³⁾ Note présentée à l'Acad. d. Sc. Paris le 28. nov. 151, 1007, 1910.

⁴⁾ Diese Zeitschr. 70, 269, 1915. Note présentée à l'Acad. d. Sc. le 1. déc. 1913.

Im experimentellen Teile sind die Ergebnisse der Versuche angeführt, die das Verhalten der Bakterie zur Lactose und der beiden, aus ihr durch Hydrolyse resultierenden Komponenten — Glucose und Galaktose — zur Anschauung bringen. Als Nährsubstrat wurde entweder entrahmte Milch ohne jeden Zusatz und dieselbe mit Kreidezusatz oder künstlicher Nährboden, den ich für den Yoghurtbacillus beantragte¹⁾, verwendet.

Die Versuchsergebnisse stimmen in mancher Beziehung mit den für *Bacterium lactis acidi* Leishmann (*Bac. acidi paralactici* Kozai, *Bacterium Güntheri* Lehmann und Neumann, *Streptococcus lacticus* Kruse) aufgestellten Charakteren überein. Unsere Bakterie ist höchstwahrscheinlich eine Varietät des bekannten gewöhnlichen, die spontane Milchsäuerung hervorrufenden Milchsäurebakteriums.

In der Milch ohne jeden Zusatz erzeugt unsere Milchsäurebakterie höchstens 0,6 bis 0,7% Milchsäure, die ihren weiteren Wachstum zum Stillstande bringt; *Bac. bulgaricus* dagegen produziert und verträgt unter gleichen Verhältnissen leicht sogar 2,3 bis 2,5% Milchsäure; das Maximum der Acidität wird bei beiden Bakterien sehr rasch erreicht, so daß man regelmäßig mit 5- bis 9tägigen Kulturen keine Gerinnung der frischen Milch mehr erzielt.

Die verursachten Zuckerverluste, dem niedrigen Säuregrad entsprechend, sind im ganzen geringfügig und betragen höchstens 16 bis 17%. Die Gesamtmenge des vergorenen Zuckers wird als Milchsäure aufgefunden, woraus zu ersehen ist, daß unser *Bacillus* eine echte Milchsäurebakterie sei.

Wird die schädliche Einwirkung der entstehenden Milchsäure durch indifferente Neutralisierungsmittel aufgehoben, so wird die Lebensdauer unserer Bakterie verlängert, so daß auch sechswöchentliche Kulturen noch gut koagulieren können, und es wird eine tiefere Vergärung des Nährmediums verursacht, bei weitem aber nicht in dem Maße, wie es beim Yoghurtbacillus beobachtet wurde. Die erzielten Zuckerverluste haben auch nach 4 Monaten nicht 50% überstiegen, wogegen beim *Bac. bulgaricus* schon in 10 bis 14 Tagen die Gesamtmenge des Zuckers, d. h. die ganzen 100%, in Milch-

¹⁾ Diese Zeitschr. 20, 100, 1909. Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. Paris 148, 1338, 1909. Annales de l'Inst. Pasteur Paris 33, 402, 1909.

säure bzw. Kalklactat übergeführt wird. Die Ursache dieser Differenzen findet ihren Grund darin, daß das Koagulum oberhalb des kohlen-sauren Kalkes einen Säuregrad besitzt und behält, der für den *Bac. paralacticus* viel zu hoch ist und weitere Milchsäuregärung hemmt, wogegen die Acidität der durch den *Yoghurtbacillus* gesäuerten Milch immer tief unter dem Säuremaximum liegt.

Die von mir vorgeschlagene Nährlösung — peptonisierter Malzkeimextrakt mit Lactose, Glucose oder Galaktose und gefälltem kohlen-sauren Kalk — entspricht am besten den Anforderungen unserer Bakterie, viel besser noch als die Milch selbst, denn die Neutralisation der schädlichen freien Säuren erfolgt hier bedeutend leichter als in der Sauermilch; der Säuregrad der Lösung erreicht nie die dem Mikroben gefährliche Grenze, die Bakterie behält daher ihre Aktivität bis zur gänzlichen Erschöpfung des Nährmediums, vergärt die Gesamtmenge der anwesenden Lactose, Glucose oder Galaktose und verschont nicht einmal die geringe Menge jener reduzierenden Zucker — vorwiegend Maltose — die durch Extraktion der Malzkeime in die Nährlösung gelangen.

Auch *Bac. bulgaricus* ist imstande, die reduzierenden Zucker des Malzkeimabsudes in Gärung mitzureißen, aber dies nur in Gegenwart von Lactose; Glucose und Galaktose entbehren dieser Fähigkeit.

Allem Anscheine nach vergärt *Bac. paralacticus* die Lactose ebensogut wie die Glucose und Galaktose, dem *Bac. bulgaricus* sind die beiden Monosaccharide entschieden bekömmlicher. Aus der durch Hydrolyse verursachten Erhöhung des Reduktionsvermögens, die bei geimpften Nährlösungen die Werte der Kontrollversuche erreicht, läßt sich folgern, daß *Bac. paralacticus* entweder die Lactose in Milchsäure direkt vergärt, oder, wenn dies unter der Mitwirkung der Lactase vor sich geht, werden die durch Hydrolyse gebildeten Monosaccharide zu Milchsäure ebenso schnell gespalten, wie sie entstanden sind.

Das Verhalten des *Bac. bulgaricus* ist ein ganz anderes; Bertrand und Weißweiller¹⁾ haben klar bewiesen, daß Yog-

¹⁾ Annal. d. Chem. **351**, 486, 1906. Annales de l'Inst. Pasteur. Paris **20**, 977, 1906.

hurtbacillus die Milchsäurebildung erst nach der vorhergegangenen Hydrolyse einleitet. Wenn wir nun weiter erwägen, daß nach meinen Versuchen¹⁾ die beiden Komponenten an und für sich durch Yoghurtbacillus leichter vergärbar sind als die Lactose, so scheint es, daß hier durch die Hydrolyse die Säuerung verzögert wird.

Durch unsere Bakterie wird die Gesamtmenge des Zuckers in rechtsdrehende Milchsäure übergeführt. Als Nebenprodukt erscheinen die flüchtigen Säuren, Essig- und Ameisensäure, in Mengen, die ca. 4,6% der Gesamtacidität entsprechen; von diesen entfällt 4,2% auf Essigsäure und 0,4% auf Ameisensäure. Alkohol und Aceton wurden nicht aufgefunden. Die quantitativen Verhältnisse sind also bei den beiden Bakterien gleich, nur im Verhalten der gebildeten Milchsäure zur Polarisationssebene ist ein Unterschied, indem *Bac. bulgaricus* eine inaktive Form der Milchsäure erzeugt.

Bac. bulgaricus bildet entweder überhaupt keine Bernsteinsäure oder nur in so geringen Mengen, daß dieselbe in den Mutterlaugen vom Zinklactat nicht einmal qualitativ bestimmt werden konnte. Es ist auch möglich, daß unsere Bakterie zu jenen Milchsäurebakterien gehört, welche die Bernsteinsäure verzehren und in flüchtige Säuren überführen, wie Freudenreich für *B. casei* α oder O. Jensen für viele Milchsäurebakterien nachgewiesen hat²⁾. Die der Bernsteinsäure naheliegenden Verbindungen, Acetylmethylcarbinol und 2,3-Butylenglykol konnten auch nicht festgestellt werden.

In den Mischkulturen mit *Bac. bulgaricus* unterliegt unsere Bakterie sehr bald; die rasch steigende Acidität des Nährsubstrates bedroht die Existenz einer jeden anderen Milchsäurebakterie, so daß schließlich immer *Bac. bulgaricus* der Sieger bleibt.

¹⁾ Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. Paris 148, 1338, 1909. Annales de l'Inst. Pasteur Paris 33, 402, 1909.

²⁾ Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 4, 196, 1898. Ldw. Jahrb. d. Schweiz 18, 314, 1904.

Experimenteller Teil.

Für die erste Versuchsreihe wurde als Nährsubstrat entrahmte Milch mit 4,6% (4,86% für *Yoghurtbacillus*) Lactose benützt, für die zweite Serie dieselbe Milch mit Zusatz von 3% gefälltem Calciumcarbonat.

Die Acidität der mit einer kleinen Menge verdünnten Milch wurde durch Titration unter Phenolphthaleinzusatz bestimmt und auf Milchsäure umgerechnet. Die durch die alleinige Titration erlangten Daten sind natürlich nicht maßgebend für die in der Milch enthaltene oder durch Säuerung erzeugte Milchsäuremenge, denn die Milchsäuerung und die Titration wird von einer ganzen Reihe von Reaktionen begleitet, durch die auch andere Bestandteile der Milch in Mitleidenschaft gezogen werden. So hat Timpe¹⁾ gezeigt, daß die mehrbasischen Phosphate und Casein keine Nährstoffe für die Milchsäurebakterien, sondern Neutralisierungsmittel für die entstehende Milchsäure sind. Es werden die zweibasischen Phosphate in einbasische, also saure, umgewandelt, sodann wird der an das Casein gebundene Kalk als milchsaurer Kalk abgetrennt, schließlich bindet das frei gewordene Casein ebenfalls eine gewisse Menge Milchsäure.

Auch die Sterilisierung übt einen großen Einfluß auf die in der Milch erzeugte Milchsäuremenge aus. Richet²⁾ und Hueppe haben gefunden, daß gekochte und bis zu Ende gesäuerte Milch eine um 0,3% geringere Säuremenge enthalte als ungekocht gesäuerte. Timpe erklärt dies dadurch, daß bei dem Erhitzen der Milch auf höhere Temperaturen die Kalksalze der Milch sich teilweise als Tricalciumphosphat abscheiden und daß dadurch ein Teil der genannten Neutralisationsmittel verloren geht.

Nicht nur bei der Vergärung allein, sondern auch bei der Titration unter Benutzung von Phenolphthalein als Indicator entscheiden über die Schlußreaktion neben Säuren auch die anderen Milchbestandteile; die gefundene Acidität ist immer größer als der wirkliche Säuregehalt, denn es wird nicht nur die freie und die an das Casein gebundene Milchsäure (Natron-

¹⁾ Arch. f. Hygiene 18, 1, 1893.

²⁾ Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. Paris 88, 750, 1879.

lauge zerlegt das milchsäure Casein) sowie die durch sie entstandenen sauren Phosphate, sondern auch das Casein neutralisiert. Dieses wird aber bis zur erfolgten Bildung der dreistufigen Verbindung (Trinatriumcasein) titriert, während es in der Milch nur in der zweistufigen enthalten ist; man titriert also um eine Stufe mehr. Außerdem fällt beim Neutralisieren der Milch dreibasisch phosphorsaurer Kalk aus, so daß man so viele Moleküle Natriumoxyd mehr verbraucht, als Calciumoxyd vorhanden ist.

Es ist auch nicht gleichgültig, ob wir die Milch direkt oder nach der Verdünnung mit Wasser titrieren; Söldner¹⁾ hat konstatiert, daß die mit Wasser verdünnte Milch höhere Daten als die direkte Titrierung liefert, weil bei der Verdünnung der Milch mit Wasser eine Löslichkeit von schwerlöslichen Phosphaten eintritt, die den Säuregrad vermindert.

Die durch das Casein, die Phosphate, die Sterilisierung und die Verdünnung verursachten Differenzen sind im ganzen minimal und heben sich teilweise gegenseitig auf; trotzdem war es empfehlenswert, die Milch vor der Titration immer mit gleicher Menge Wasser zu verdünnen und die anderen Fehler, die durch Anwendung des Phenolphthaleins als Indicator entstehen, auf Grund der ebenso durchgeführten Titrierung der ungeimpften Kontrollversuche auszugleichen. Der Säuregrad der Kontrollversuche wurde immer von der Acidität der geimpften Versuche in Abzug gebracht, so daß die Tafel den Zuwachs an Acidität durch die Säuerung direkt angibt.

Die gewonnenen Daten für Lactoseprocente und für das Rendement ($= 100 \times \text{Milchsäure} : \text{Lactose}$) sind auf ganze Zahlen abgerundet.

Jeder Analyse ging die Überimpfung in neue Milch voraus, und das Alter der Bakterie wurde durch Milchgerinnung kontrolliert. Der negative Befund bedeutete das Absterben des Mikroben und ist in der Tafel mit 0, die normale Koagulation mit + bezeichnet.

Für die anderen Versuchsreihen wurde ein künstliches Nährsubstrat, Malzkeimextrakt, verwendet, das sich als bestes für Milchsäurebakterien bewährte. Unter allen künstlichen

¹⁾ Landwirtsch. Versuchsstat. 35, 351, 1888.

Nährböden war es das einzige, womit ich imstande war, bei der Kultivierung des Yoghurtbacillus die Milch zu ersetzen. Vermutlich hängt dieser Umstand mit der besonders günstigen Zusammensetzung der Malzkeime zusammen¹⁾, die eine bedeutende Menge stickstoffhaltiger Substanzen, die zur Ernährung der Mikroorganismen sehr befähigt sind (Amide) enthalten; auch auffallend ist die schöne Übereinstimmung in der Zusammensetzung der Aschebestandteile der Malzkeime und der Milch²⁾, die doch als das beste Nährsubstrat für die Züchtung der Milchsäurebakterien gilt.

Bei den Kontrollversuchen wurde in 100 g Nährlösung gefunden:

1. Mit Lactose: 3,89 bzw. 4,09 g Zucker, wovon 0,297 g bzw. 0,313 g in Lactose ausgedrückt auf den reduzierenden Zucker des Malzkeimextraktes entfielen.

2. Mit Glucose: 4,235 Zucker inkl. 0,208 g der in Glucose ausgedrückten reduzierenden Substanz des Malzkeimabsudes.

3. Mit Galaktose: 4,004 bzw. 3,980 g Zucker inkl. 0,221 bzw. 0,208 der auf Galaktose umgerechneten reduzierenden Bestandteile des Extraktes.

Da die mit Calciumcarbonat versetzten Nährlösungen sehr schwer zu sterilisieren sind, wurde ihrer Sterilisierung nach den gewonnenen Erfahrungen eine besonders große Sorgfalt gewidmet, und nur solche Nährlösungen wurden verwendet, die nach der fraktionierten Sterilisierung längere Zeit bei 45° aufbewahrt, unverändert geblieben sind.

Die Impfung sämtlicher Lösungen geschah an einem und demselben Tage mit der gleichen Menge einer und derselben immer 2-tägigen, rasch koagulierenden Kultur, und sie wurden sodann in den Brutschrank bei 30° eingesetzt.

¹⁾ Nach König, Die menschlichen Nahrungs- und Genußmittel, Berlin 1904: Wasser 12,00%, stickstoffhaltige Substanzen 23,11% (rein Protein 16,28%), Fett 2,05%, stickstofffreie Substanzen 43,01%, Cellulose 12,32%, Asche 7,51%.

²⁾ Aschenbestandteile der Malzkeime nach König (l.c.): K₂O 30,81%, Na₂O 1,77%, CaO 2,85%, MgO 2,76%, Fe₂O₃ 1,56%, P₂O₅ 26,96%, SO₃ 4,04, SiO₂ 22,07%, Cl 6,94%. — Aschenbestandteile der Milch nach Laxa: K₂O 25,42%, Na₂O 10,94%, CaO 21,45%, MgO 2,54%, Fe₂O₃ 0,11%, P₂O₅ 24,11%, SO₃ 4,11%, Cl 14,60%.

Die Analysen der geimpften Versuche wurden nach mehr-tägigen Intervallen vorgenommen, und gleichzeitig wurde die Reinheit der Kultur und Koagulationsfähigkeit kontrolliert, deren negatives Ergebnis als Beendigung des Versuches angesehen wurde.

Die Bestimmung des in den Nährlösungen enthaltenen Zuckers wurde nach der Methode Bertrands¹⁾ ausgeführt. Die Acidität wurde durch Titration mit $\frac{1}{5}$ -Natronlauge unter Benutzung des Phenolphthaleins ermittelt und als Milchsäure berechnet, in einigen Fällen aber aus dem in Lösung übergeführten Calciumcarbonat ermittelt²⁾.

Die Ergebnisse der Versuche, auf Grund deren die in der Einleitung angeführten Schlußfolgerungen gezogen wurden, sind in den Tabellen I bis V enthalten. Die in Klammern angeführten Daten betreffen den Bacillus bulgaricus, der mit dem Bacillus paralacticus parallel gezüchtet wurde.

Tabelle I.

Abgerahmte Milch ohne Zusatz.

Für 100 g Milch:

Alter der Kultur in Tagen	Lactose vergoren		Milchsäure		Koagulation der Milch
	mg	%	gefunden in mg	aus 100 Teilen Zucker gebildet	
5	640 (1958)	14 (40)	657 (2115)	102 (108)	+ (+)
9	720 (2079)	15 (43)	657 (2232)	91 (112)	0 (+)
14	740 (2063)	16 (42)	784 (2196)	106 (106)	0 (0)
19	760 (2042)	16 (42)	866 (2277)	114 (111)	0 (0)
27	480 (2042)	10 (42)	576 (2313)	120 (113)	0 (0)
38	800*) (2126**)	17 (44)	711 (2313)	89 (109)	0 (0)

*) 4630 mg im Kontrollversuch.

**) 4861 mg im Kontrollversuch.

Nachdem der bulgarische Bacillus die Glucose leichter zu vergären vermag als die Lactose, wogegen Bacillus paralacticus sich zu den beiden Zuckern gleich verhält, konnte man voraussetzen, daß auch in der Art und Weise der Überführung der Lactose in Milchsäure zwischen beiden Mikroben Differenzen bestehen werden. Schon Bertrand und Weißweiller³⁾ haben

1) Bull. de la Soc. chim. de Paris 1906.

2) Nähere Details siehe diese Zeitschr. 70, 269, 1915.

3) l. c.

Tabelle II.

Abgerahmte Milch mit Calciumcarbonatzusatz.
Für 100 g Milch:

Alter der Kultur in Tagen	Lactose vergoren		Milchsäure		Koagulation der Milch
	mg	%	gefunden in mg	aus 100 Teilen Zucker gebildet	
5	1320 (3350)	28 (69)	— <i>1809</i>	— —	+ (+)
9	1730 (4370)	37 (90)	<i>729*</i> <i>1535</i>	— —	+ (+)
14	2025 (4861)	44 (100)	<i>612</i> <i>963</i>	— —	+ (+)
19	1905 (4861)	42 (100)	<i>576</i> <i>882</i>	— —	+ (+)
27	2370 (4861)	51 (100)	<i>387</i> —	— —	+ (+)
38	1845 (4861)	40 (100)	2040 —	100 —	+ (+)
139	2353**)(4861***)	51 (100)	2790 (5298)	118 (109)	0 (+)

*) *Kursiv gedruckte Zahlen* bedeuten die Acidität der Milch oberhalb des Calciumcarbonates.

***) 4630 mg im Kontrollversuch.

***) 4861 mg im Kontrollversuch.

Tabelle III.

Künstliche Nährlösung mit Lactose.
Für 100 g Lösung:

Alter der Kultur in Tagen	Lactose vergoren		Milchsäure		Koagulation der Milch
	mg	%	gefunden in mg	aus 100 Teilen Zucker gebildet	
5	1440 (1118)	37 (30)	— (<i>270</i>)	— —	+ (+)
9	1590 (1990)	40 (53)	<i>180*</i> —	— —	+ (+)
24	3189 (2930)	82 (78)	— (<i>240</i>)	— —	+ (+)
33	3890 (3040)	100 (80)	4007 (3283)	103 (108)	+ —
38	3890 (4090)	100 (100)	4491 (4172)	115 (102)	+ (0)
60	3890 (4090)	100 (100)	— —	— —	+ (0)
90	3890**)(4090***)	100 (100)	<i>225</i> —	— —	+ (0)

*) *Kursiv gedruckte Zahlen* bedeuten die Acidität der Lösung oberhalb des Calciumcarbonates.

***) d. i. 3593 mg Lactose + 297 mg des reduzierenden Zuckers des Malzkeimextraktes.

****) d. i. 3777 mg Lactose + 313 mg des reduzierenden Zuckers des Malzkeimextraktes.

konstatiert, daß Yoghurtbacillus die Lactose zuerst in ein Gemenge von gleichen Teilen Glucose und Galaktose hydrolysiert und erst diese Monosaccharide vergärt. In ähnlicher Weise wie die beiden Forscher habe ich beim Bacillus paralacticus das Reduktionsvermögen vor und nach der Hydrolyse bei verschiedenem Alter der Kultur festgestellt und die durch Hydro-

Tabelle IV.

Künstliche Nährlösung mit Glucose.

Für 100 g Lösung:

Alter der Kultur in Tagen	Glucose vergoren		Milchsäure		Koagulation der Milch
	mg	o/o	gefunden in mg	aus 100 Teilen Zucker gebildet	
5	1550 (2970)	36 (74)	— —	— —	+ (+)
9	2210 (3910)	52 (97)	270* (891)	— —	+ (+)
14	3485 (3675)	82 (91)	270 —	— —	+ (+)
19	3485 (4027)	82 (100)	270 (198)	— —	+ (+)
27	4035 (4027)	95 (100)	225 (198)	— —	+ (+)
38	4235 (4027)	100 (100)	4491 —	106 —	+ (+)
147	4235** (4027***)	100 (100)	4193 (4188)	99 (104)	0 (0)

*) *Kursiv gedruckte Zahlen* bedeuten die Acidität der Lösung oberhalb des Calciumcarbonates.

**) d. i. 4027 mg Glucose + 208 mg des reduzierenden Zuckers des Malzkeimextraktes.

***) Es wurde nur Glucose (4027 mg) vergoren; 208 mg des reduzierenden Zuckers des Malzkeimextraktes blieb unvergoren.

Tabelle V.

Künstliche Nährlösung mit Galaktose.

Für 100 g Lösung:

Alter der Kultur in Tagen	Galaktose vergoren		Milchsäure		Koagulation der Milch
	mg	o/o	gefunden in mg	aus 100 Teilen Zucker gebildet	
6	1962 (2339)	49 (62)	220* —	— —	+ (+)
10	2082 (3772)	52 (100)	— —	— —	+ (+)
18	2963 (3772)	74 (100)	270 —	— —	+ (+)
32	3864 (3772)	96 (100)	— —	— —	+ (+)
48	4004 (3772)	100 (100)	180 (4224)	— (112)	+ (+)
96	4004 (3772)	100 (100)	4324 —	108 —	+ (0)
140	4004** (3772***)	100 (100)	— —	— —	0 (0)

*) *Kursiv gedruckte Zahlen* bedeuten die Acidität der Lösung oberhalb des Calciumcarbonates.

**) d. i. 3783 mg Galaktose + 221 mg des reduzierenden Zuckers des Malzkeimextraktes.

***) Es wurde nur Galaktose (3772 mg) vergoren; 208 mg des reduzierenden Zuckers des Malzkeimextraktes blieb unvergoren.

lyse verursachte Reduktionsvermögenserhöhung berechnet. Ist somit nach Duclaux¹⁾ das Reduktionsvermögen der Lactose 70, so erreicht dasselbe nach Hydrolyse 98, und die Erhöhung

¹⁾ Traité de microbiologie, Paris 4, 1901.

des Reduktionsvermögens beträgt daher ca. 40⁰/₀. Ich fand für den *Bacillus paralacticus*:

Alter der Kultur in Tagen	<i>Bacillus paralacticus</i>	<i>Bacillus bulgaricus</i> (Bertrand u. Weißweiller)
Kontrollversuch	42,2	43,7
3	39,6	16,8
5	41,8	7,6
12	40,7	4,3
30	36,3	5,3

Aus der Erhöhung des Reduktionsvermögens ließ sich also beim bulgarischen *Bacillus* die Mitwirkung der Lactase feststellen; selbstverständlich läßt sich aus dieser Differenz das Verhältnis zwischen der verbliebenen Glucose und Galactose nicht beurteilen. Beim *Bacillus paralacticus* stimmen die bei geimpften Versuchen ermittelten Daten mit jenen der Kontrollversuche überein; es konnte hier daher keine Bildung des betreffenden Enzyms nachgewiesen werden. Wenn unsere Bakterie die Lactose nicht direkt säuert, so kann sich der Vorgang nur in der Weise abspielen, daß die Spaltung des Zuckers in Milchsäure gleichen Schritt mit der Hydrolyse hält, so daß in allen Fällen dann nur Lactose allein vorhanden ist.

Die Analysen der Nährlösungen¹⁾, die in 600 ccm 24,54 g Lactose inkl. 1,878 g der reduzierenden Substanz des Malzextraktes enthielten, wurden nach 35 Tagen, jene mit Yoghurtbacillus nach 33 Tagen (die Zahlen in Klammer) durchgeführt; sie hatten das nachstehende Resultat:

An gebundener Milchsäure wurde durch Titration des ungelöst verbliebenen Calciumcarbonats gefunden: 22,36 g (24,138).

Die Acidität des Filtrates auf Milchsäure umgerechnet (nach Verseifung des Esters, in den ein Teil der Milchsäure übergeht) beträgt 1,35 g (1,386).

Freie und gebundene Säuren in Milchsäure ausgedrückt 23,71 g (25,524).

Nach Abrechnung der übrigen flüchtigen und nichtflüchtigen Säuren erübrigt auf Milchsäure 22,624 g (24,300),

¹⁾ Nähere Daten siehe: Ducháček, Über den Yoghurtbacillus, diese Zeitschr. 70, 269, 1915.

d. i. 90⁰/₀ (94⁰/₀ in Hexosen gerechnet) Lactose inkl. des reduzierenden Zuckers im Extrakte, sind bei beiden Mikroben in Milchsäure übergeführt worden.

Im Filtrate wurde . . . 1,667 g (0,0) Lactose gefunden, die Bakterie hat daher . . . 22,662 g = 100⁰/₀ der zugesetzten Laktose und 0,211 g = 11⁰/₀ der reduzierenden Substanzen des Malzkeimabsudes vergoren, die schwerer vergärbbar sind und eine längere Versuchsdauer erheischen würden. (Bacillus bulgaricus verbrauchte 22,662 g = 100⁰/₀ der zugesetzten Lactose und 1,878 = 100⁰/₀ des reduzierenden Zuckers des Extraktes.)

Nach Ausfällung der Kalksalze wurde durch Destillation 0,724 g (0,785) der flüchtigen, auf Essigsäure umgerechneten Säuren gewonnen, d. i. bei beiden Mikroben 4,6⁰/₀ der Gesamtacidität. Das Verhältnis der flüchtigen zu den nichtflüchtigen Säuren ist bei beiden Bakterien durch die Zahlen 1 : 30 zum Ausdruck gebracht.

Unter den flüchtigen Säuren wurde neben der Essigsäure, die durch Silbersalz, durch Bildung von Acetylacetat, Kakodyloxyd und Kakodyl, auch die Ameisensäure gefunden, deren Gegenwart durch Reduktion des Silbersalzes beim Erhitzen und durch Bildung des Äthylesters bestätigt wurde.

Die Ameisensäure wurde auch quantitativ in Form des Bleiformiats bestimmt, wovon 0,152 g (0,220) erhalten wurden; dem entspricht 0,047 g (0,068) Ameisensäure, d. i. beiläufig 0,4⁰/₀ (0,5) der Gesamtacidität.

Aus der Differenz wurde die Essigsäuremenge 0,663 g (0,696), d. i. 4,2⁰/₀ (4,1) der Gesamtacidität berechnet.

Von den anderen, bei der Milchsäuregärung auftretenden flüchtigen Produkten, wurden Alkohol und Aceton in eigenen Versuchen mit negativem Ergebnisse gesucht.

Nach dem Abdampfen der flüchtigen Bestandteile wurde der zurückgebliebene Sirup mit Äther extrahiert und die im Ätherextrakte enthaltene Milchsäure in Zinklactat übergeführt, welches in zwei Portionen gewonnen wurde:

I. Krystalle	24,173 g (18,7350)
II. "	2,700 g (2,5438)
Im ganzen	26,873 g (21,2788)

Durch die Analyse des milchsauren Zinks wurde gefunden:

I. Krystalle	{	H ₂ O (bei 105°)	12,56%	(18,0)
		ZnO (durch Calcination)	29,20%	(28,0)
		[α] _D	—7,77°	(± 0)
II. Krystalle	{	H ₂ O (bei 105°)	12,88%	(18,04)
		ZnO (durch Calcination)	29,20%	(28,12)
		[α] _D	—7,34°	(± 0°)

Die Daten stimmen vollkommen überein mit der Zusammensetzung des l-Lactates (C₃H₅O₃)₂ Zn + 2H₂O, der 12,89% H₂O und 29,03% Zn enthält und [α]_D = —9° hat. Die Differenzen im Drehungsvermögen sind nach Jungfleisch und Godchot¹⁾ durch verschiedene Konzentration verursacht. Unsere Milchsäurebakterie erzeugt demnach Rechtsmilchsäure, denn die aktiven Zinklactate drehen die Polarisationssebene in entgegengesetzter Richtung als die ihnen entsprechenden Säuren.

Der bulgarische Bacillus gab unter denselben Verhältnissen inaktive Milchsäure, ein Gemenge von Molekularmengen zweier gleich stark, aber entgegengesetzt drehender Milchsäuren; die Zusammensetzung des auskristallisierten Lactates stimmt überein mit dem racemischen Zinklactate (C₃H₅O₃)₂ Zn + 3H₂O: H₂O 18,18%, Zn 27,27%, [α]_D = ± 0°.

Es ist möglich, daß auch Bacillus paralacticus die inaktive Milchsäure bildet und ähnlich wie manche chemische Reagenzien (Alkalien) die Lactose in ein genau racemisches Gemenge von r- und l-Milchsäure spaltet; diese Säuren werden aber weiter geändert und auf bisher noch unbekannte Weise eine optisch aktive Komponente in die andere übergeführt. Durch Verzehung der linken Form, wie ich sie beim Effrontschen Bacillus²⁾ konstatierte, läßt sich der Vorgang nicht erklären, denn die Zuckerverluste stimmen immer genau überein mit der entstandenen Milchsäuremenge, die sonst nur der Hälfte des vergorenen Zuckers entsprechen müßte.

In den Mutterlaugen vom Zinklactat wurde vergebens die Bernsteinsäure, die Yoghurtbacillus unter gleichen Umständen 0,063 g lieferte, gesucht. Die Mutterlauge enthielt nur eine

¹⁾ Compt. rend. de l'Acad. d. Sc., Paris 140, 719.

²⁾ l. c.

kleine Menge Milchsäure in Lactatform, neben dem sich die Bernsteinsäure nicht nachweisen ließ.

Ergebnislos waren auch die Versuche, die zwecks Bestimmung der interessanten Verbindungen: Acetylmethylcarbinol $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_3$ und 2,3-Butylenglykol $\text{CH}_3 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_3$ angesetzt wurden. Diese zur Bernsteinsäure $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ in enger chemischer Beziehung stehenden Verbindungen haben Harden und Walpole¹⁾ zum ersten Male mit *Bacillus lactis aerogenes* gefunden.

¹⁾ Proc. Roy. Soc. 77, 399, 1906.

Über die Entwicklung der typischen Blattglykoside in der keimenden und wachsenden Digitalispflanze.

Von

Walther Straub.

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

(Eingegangen am 21. März 1917.)

Mit 3 Tafeln.

Die wirksamen Glykoside des Digitalisblattes unterscheiden sich scharf von denen des Samens der Pflanze. Nachdem ich¹⁾ in einer früheren Untersuchung die quantitative Aufarbeitung der Samen und Blätter von *Digitalis purpurea* mit Hilfe chemischer Trennungs- und pharmakologischer Meßmethoden durchgeführt hatte, ging ich an das pflanzenphysiologische Problem des Titels.

Die wirksamen Samenglykoside der Digitalispflanze sind das Digitalinum verum $C_{35}H_{46}O_{14}$ (Kiliani) und das Digitalein (Kiliani und Windaus), beide löslich in Wasser. Die Blattglykoside sind das Digitoxin $C_{34}H_{54}O_{11}$ (Schmiedeberg, Kiliani), unlöslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol und in Chloroform, das Glykosidgemenge „Gitalin“ [Kraft²⁾] löslich in Chloroform und in kaltem Wasser, in heißem Wasser und in Alkohol nur unter teilweiser Zersetzung und Entwertung löslich, und als drittes des Digitalein (Kiliani und Windaus), das auch in den Samen vorkommt. Spezifisch sind also Digitalinum verum für Samen und Digitoxin sowie „Gitalin“ für Blätter.

Eine Trennung ohne Verlust ist bei den Samenglykosiden mit der für meinen Zweck nötigen Einfachheit der Prozedur

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak. 1916, 80, 52.

²⁾ Zwar keine einheitliche Substanz, aber doch eine einheitliche Fraktion bei der chemischen Aufarbeitung.

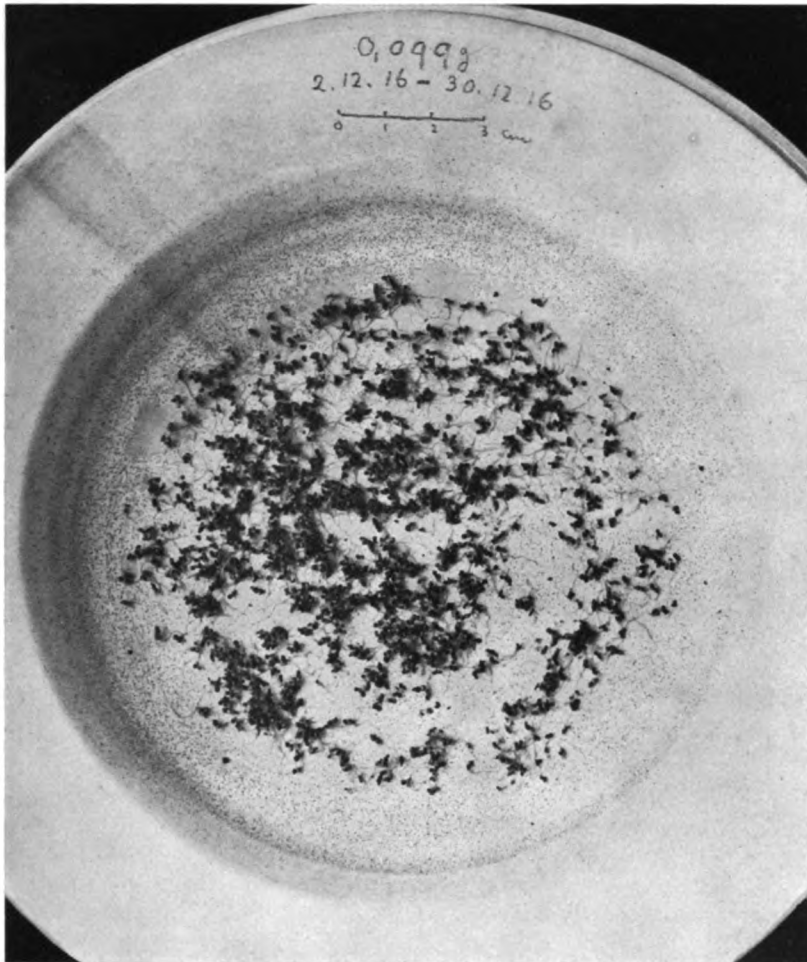


Fig. 1.

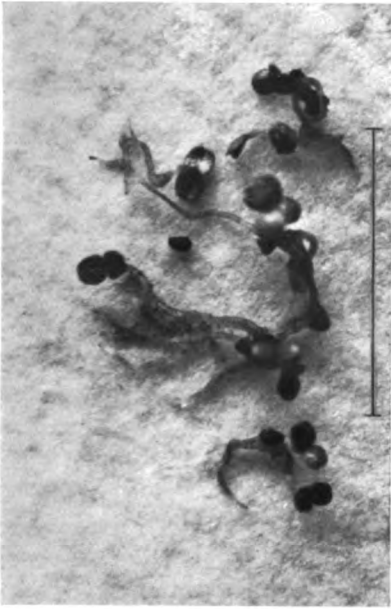


Fig. 2.

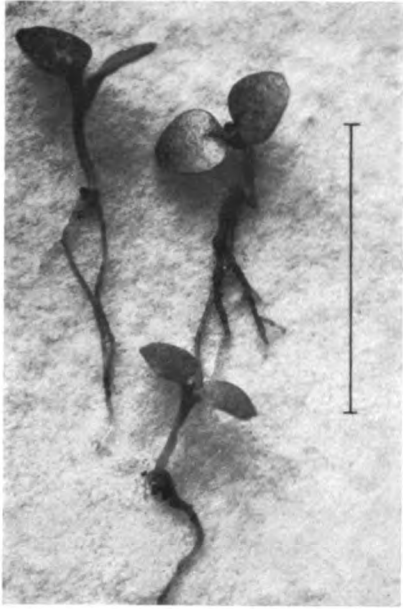


Fig. 3.

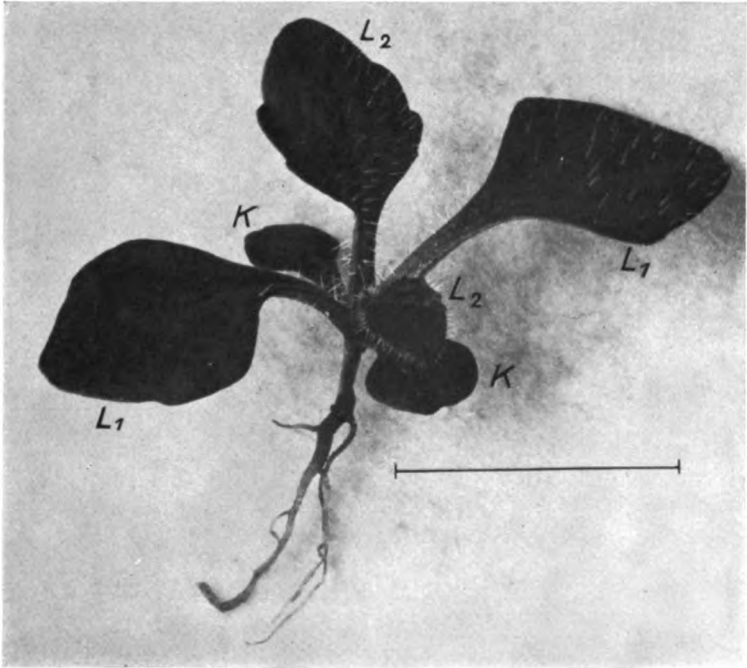


Fig. 5.

Straub, Über die Entwicklung der typischen Blattglykoside in der Digitalispflanze.

Verlag von Julius Springer in Berlin

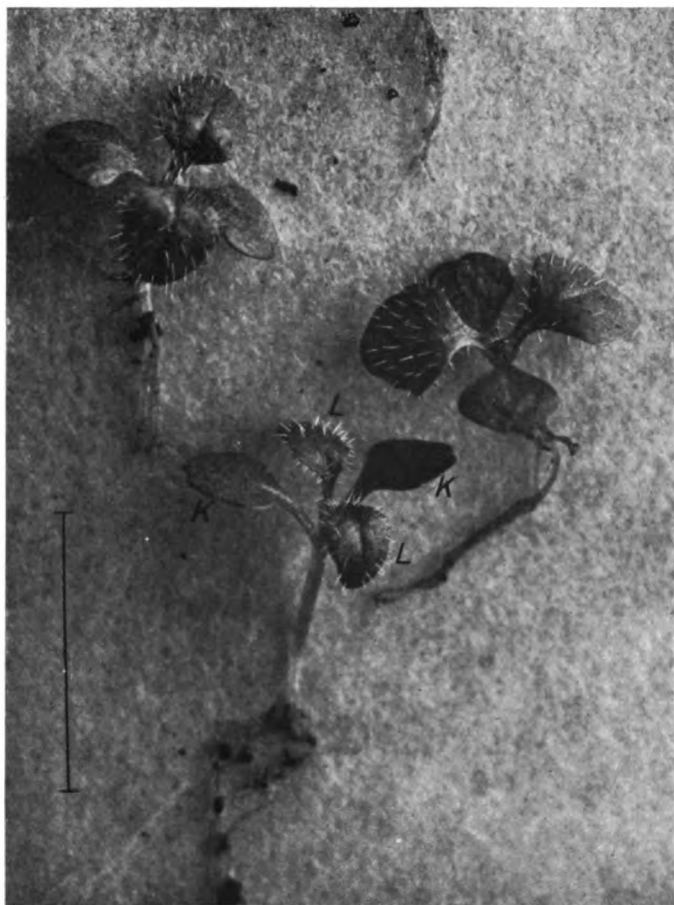


Fig. 4.

nicht möglich, hingegen lassen sich die Blattglykoside gut in drei je eines der Glykoside enthaltende Fraktionen zerlegen. Die erschöpfende Extraktion der feinst zerriebenen Blätter mit kaltem Wasser liefert zunächst die Summe „Gitalin“ + Digitalein, Ausschütteln dieses Kaltwasserextraktes mit Chloroform, liefert in der Chloroformlösung das „Gitalin“, in der zurückbleibenden Wasserlösung das Digitalein, eine zweite Extraktion der vorher mit kaltem Wasser erschöpften Blätter mit warmem 70%igen Alkohol ergibt das Digitoxin.

Die so erhaltenen Fraktionen werden mit der pharmakologischen Meßmethode titriert. Die Einheit (F. D. = Froschdosis genannt) dieser Messung¹⁾ ist diejenige Menge des fraglichen Extraktes, die ein Gramm Gewicht des männlichen Grasfrosches unabhängig von einer Wirkungszeit eben gerade tötet. Diese einfachste Methode ist zugleich auch die zuverlässigste, sie hat eine Genauigkeit von mindestens 10%₀. Die so in den einzelnen Fraktionen erhaltenen Werte werden dann bezogen auf die Titer der in der jeweiligen Fraktion enthaltenen alleinigen Reinsubstanz. Diese Titer sind:

Digitalinum verum	0,000 006 1
Digitoxin	0,000 0036 5
Digitalein	ca. 0,000 005
Gitalin	0,000 005 85.

Auf diese Weise fand ich im Samen einen Gehalt von ca. 2%₀ Aktivglykosid (Digitalinum verum + Digitalein)²⁾. Im Blatt, Folia titrata von Caesar und Loretz sind ca. 1%₀ Aktivglykoside enthalten, und zwar etwa 0,40%₀ Digitalein, 0,35%₀ Gitalin und 25%₀ Digitoxin.

Versuche.

Es wurde eine einzige Sorte Samen verwandt, der von einer im Herbst 1916 am Schwarzwälder Belchen gewachsenen Pflanze stammte. Um in den frühesten Stadien der keimenden Samen quantitativ arbeiten zu können, durften wegen der Kleinheit der Samen nur Wasserkulturen angelegt werden.

¹⁾ E. M. Houghton, Journ. Americ. Med. Assoc. 1898.

²⁾ Der in meiner früheren (l. c.) Untersuchung gefundene Wert von 1,0%₀ gilt nur für die dort untersuchten Samen. Nach vielen weiteren Messungen ist ein Durchschnittswert von 2%₀ zutreffend.

Poröse Thonteller wurden auf dem Gasbrenner sterilisiert, nach dem Erkalten mit einer Knopschen Lösung getränkt und auf einen glasierten, ebenfalls mit Nährlösung beschickten Teller gestellt, in dem das verdunstende Wasser täglich erneuert wurde. Die Samen, die bekanntlich im Licht am besten keimen, wurden auf dem porösen Tonteller ausgesät und im Treibhaus bei durchschnittlich 15° ab November 1916 zur Entwicklung gebracht. Auf diese Weise gelang es leicht, ohne Schimmelinfection Reinkulturen zur Entwicklung zu bringen. Die meist mitwachsenden einzelligen Algen sind belanglos (Fig. 1).

Diese Wasserkultur befriedigt aber nur bis zur völligen Entwicklung und Ergrünung der Keimblätter (Fig. 1 u. 2). Zum Studium der Vorgänge beim wirklichen Wachstum muß die Humuskultur verwendet werden. Zur Analyse wurden die Pflanzen aus dem stark befeuchteten Beet mit der Pinzette einzeln mit allen Wurzeln ausgelesen, zur Entfernung anhaftender Erdpartikel in Wasser abgeschwenkt und sofort zur Verarbeitung genommen (Fig. 3).

So wurden 5 der jüngsten Stadien untersucht:

1. Radiculastadium,
2. Ergrünte Keimblätter (Fig. 1 u. 2),
3. Vollentwickelte Keimblätter, 2. Blattpaar in Anlage (Fig. 3),
4. 2. Blattpaar entwickelt, 3. Blattpaar in Anlage (Fig. 4),
5. Vollentwickeltes 3. Blattpaar (Fig. 5).

A. Analyse des Samenmaterials.

Lufttrockener Samen $0,318 \text{ g} = 5180$ Stück werden im Achatmörser zerrieben und dann im Vakuumexsiccator völlig getrocknet: Endgewicht $0,288 \text{ g} = 9,0\%$ Wassergehalt, 91% Trockensubstanz. Das Trockenpulver mit Petroläther völlig extrahiert, gibt ab $0,122 \text{ g}$ Fett $= 42,5\%$ des vakuumtrocknen Materials oder $38,4\%$ des lufttrocknen. Das entfettete Pulver wird erst mit $16 \text{ ccm } 80\%$ Alkohol geschüttelt, Alkohol abgegossen, abermals mit $14 \text{ ccm } 30\%$ Alkohol in der Wärme digeriert. Die abgenutzten Alkoholextrakte vereinigt, im Vakuum getrocknet, Rückstand in 10 ccm Wasser gelöst.

Von diesen 10 ccm töten 0,00917 (= 1 F. D.) eben gerade 1 g Grasfrosch (Titer). Es sind also in 10 ccm = 0,3 g = 5180 Stück lufttrockener Samen enthalten: 1090 F. D.

Der Titer des Digitalinum verum ist 0,0000061 g pro Gramm Frosch, der des Digitalein kann als etwa ebenso groß angenommen werden, so daß das Samenmaterial enthält: 0,0069 g Aktivglykosid oder 2,17% im lufttrocknen und 2,39% im exsiccator-trockenen Material.

B. Die keimende und wachsende Pflanze.

1. Radiculastadium. 18 Tage nach der Aussaat war die Samenhülle gesprengt und das Keimwürzelchen etwa 1 mm weit vorgedrungen. Die genaue Durchsichtung der Kultur zeigte, daß alle Samen gekeimt hatten.

Aussaat 31. 12. 16. Gewicht 0,164 g lufttrocken (exsiccator-trocken = 0,147 g) = 2678 Stück.

Ernte 16. 1. 17. Gewicht 0,315 g; exsiccator-trocken = 0,144 g (Verlust 0,003 g).

Die Samen haben an Trockensubstanz nicht abgenommen; der gefundene kleine Verlust geht auf Rechnung kleiner Verluste beim Ablösen von der Unterlage.

Material mit Petroläther entfettet, gibt auf Trockengewicht berechnet ab 32,6%. Der wässrig-alkoholische Extrakt enthielt 556 F. D.

Rechnet man diese 556 F. D. als Samenglykosid Digitalinum verum, so ergibt sich ein Gehalt von 2,35% für das exsiccator-trockene Material. Es ist also bei der Keimung von wasserlöslichem Aktivglykosid nichts verloren gegangen.

Es ist aber noch zu untersuchen, 1. ob im wasserlöslichen Anteil schon das Blätterglykosid „Gitalin“ enthalten ist und 2. ob sich das Blätterglykosid Digitoxin im mit Wasser extrahierten Rückstand schon findet.

Deshalb wird ad 1. der wässrige Extrakt mit Chloroform geschüttelt, das Chloroform abgetrennt und verdunstet, der Rückstand in kaltem Wasser gelöst und an Fröschen ausgewertet. Es wurden auf diese Weise 46 F. D. Aktivglykosid gefunden, das wären nach dem „Gitalin-Titer“ von 0,00000585 im ganzen 0,00027 g Gitalin.

Das Digitalinum verum ist nun allerdings für die Zwecke der Isolierung aus dem Rohmaterial in Chloroform „unlöslich“; handelt es sich aber um so empfindliche analytische Nachweismethoden wie die am Frosch, so zeigt sich im orientierenden Versuch, daß es unter den Bedingungen, die bei der obigen Aufarbeitung gegeben sind, doch wenigstens soweit in Chloroform löslich ist, daß nachweisbare Mengen in dieses eingehen. Ich habe deshalb den für diese Verhältnisse wichtigen Teilungskoeffizient des Digitalinum verum (Reinsubstanz von Kiliiani) zwischen Chloroform und Wasser ermittelt¹⁾ und fand ihn 0,032. D. h. die Substanz löst sich etwa 30mal leichter in Wasser wie in Chloroform.

Bei der Extraktanalyse waren 10 ccm Wasserphase (mit 556 F. D. Glykosid) mit 20 ccm Chloroform, enthaltend 46 F. D. im Gleichgewicht, das gefundene Konzentrationsverhältnis war also $\frac{55 \cdot 6}{2 \cdot 3} = 24$. Dies stimmt mit dem experimentell bestimmten Koeffizienten von ca. 30 so gut überein, als es unter solchen Umständen überhaupt zu erwarten ist, so daß sich ergibt, daß die Chloroformfraktion tatsächlich kein Gitalin, sondern nur Digitalinum verum enthielt. Mithin ist also in diesem Entwicklungsstadium das Blattglykosid „Gitalin“ noch nicht vorhanden²⁾.

ad 2. Digitoxin. Zu seinem Nachweis wurde das mit Wasser erschöpfte Samenpulver scharf abgenutscht und neuerdings mit Alkohol extrahiert. Die verdünnt alkoholische Lösung des Extraktes war am ganzen Frosch unwirksam, am ausgeschnittenen Herzen nach meiner³⁾ Anordnung geprüft, hatte der eine zur Analyse gewonnene Kubikzentimeter etwa

¹⁾ Indem ich eine wässrige Lösung von Digitalinum verum mit dem gleichen Volum Chloroform schüttelte und in der Chloroformphase die Konzentration mit Fröschen titrierte. Ebenso wird mutatis mutandis der Teilungskoeffizient $\frac{\text{konz. Chlf.}}{\text{konz. aq.}}$ für Gitalin mit 5,3, für Digitoxin mit etwa 22000 bestimmt.

²⁾ Übrigens kann man Gitalin und Digitalium verum schon an der Art der Wirkung unterscheiden. Ersteres wirkt in höchstens einer Stunde, letzteres braucht viele Stunden zur tödlichen Endreaktion. Der untersuchte Extrakt wirkte langsam.

³⁾ Diese Zeitschr. 28, 1910.

die Konzentration $\frac{1}{750000}$; das entspricht einer so geringen Menge von Glykosid, daß es sich wohl nur um den in den Poren des Pulvers hinterbliebenen Rückstand handeln kann. Mithin sind die Pflanzen des Stadiums auch digitoxinfrei.

Im Radiculastadium ist also der Samenglykosidgehalt weder quantitativ noch qualitativ geändert.

2. Stadium der ergrünnten Keimblätter, repräsentiert durch Fig. 1 u. 2, ist nach 28 Tagen erreicht, die leeren Samenhüllen hängen z. T. noch an den Keimblättern. Der Gang der Untersuchung ist von jetzt ab derselbe wie in 1.

Saatmenge 0,099 g lufttrocken = 0,090 g exsiccator-trocken
= 1622 Pflanzen.

Ernte 0,640 lufttrocken = 0,099 g exsiccator-trocken =
15% Trockensubstanz, 85% Wassergehalt.

Also Wachstum der frischen Pflanze: 6,5fach; der Trockensubstanz 1,09fach.

Petrolätherextrakt¹⁾ 0,032 g = 15% der lufttrocknen,
32,4% der absolut trocknen Ernte.

Da der Fettgehalt der Saat 42,5% betrug, ist also ein Verlust von 10,1% Fett aufgetreten und dementsprechend ein gleichwertiges Wachstum der fettfreien Trockensubstanz, da Trockengewicht von Saat und Ernte annähernd gleich geblieben sind.

Die Auswertung der Glykoside ergab 326 F. D. in der Wasserfraktion, mit Berücksichtigung des Teilungsverhältnisses (s. o.) nichts in der „Gitalin“-Unterfraktion und ebenso nichts in der Digitoxinfraktion. Es ist also nur Digitalinum verum enthalten.

326 F. D. Digitalinum verum sind $326 + 0,0000061 = 0,00199$ g Reinsubstanz auf 0,091 g Trockensaat = 2,18%. Diese enthielt nach A im ungekeimten Zustande 2,39%, es ist also im vierwöchentlichen Wachstum ein Glykosidschwund 0,21%, eine zu vernachlässigende Größe entstanden, man muß sagen, daß auch die Entwicklung und das Ergrünen der Keimblätter nichts am Bestand der Samenglykoside ausgemacht hat.

¹⁾ Die geringe im Extrakt enthaltene Menge Chlorophyll kann vernachlässigt werden.

3. Vollentwickelte Keimblätter, das erste Laubblattpaar als Knospe sichtbar. Vgl. Fig. 3. Humuskultur von 33 Tagen Alter.

Material 600 Pflanzen (entsprechend einem Samentrockengewicht von 0,033 g).

Feuchtgewicht der Ernte 0,802 g, Vakuumtrockengewicht 0,116 g = 14,5% Trockensubstanz.

Petrolätherextrakt = 3,44% der Trockensubstanz.

Es hat also eine 3,8fache Vermehrung der Trockensubstanz stattgefunden, die fast ganz von nichtfetter Substanz bestritten wird.

Die Auswertung ergab in der Wasserfraktion 138 F. D. = 0,00084 g Rein-Digitalinum verum

oder auf Trockengewicht der Ernte berechnet 2,56%.

Im Samen waren enthalten 2,39%.

Also eine Zunahme des Digitalinum verum um 0,17%, eine Differenz, die besonders deswegen zu vernachlässigen ist, weil nur 600 Pflanzen gegen 1622 des Stadiums 2 verarbeitet wurden, deshalb für die scharfe Titerbestimmung zu wenig Extrakt gewonnen werden konnte, die Grenzwerte der Titrierung differierten noch um 25%.

In die Gitalinfraktion ging nur nach Maßgabe des Teilungskoeffizienten das Digitalinum verum ein.

Die Digitoxinfraktion enthielt — nur am ausgeschnittenen Herzen meßbar — 1 F. D., also eine ebenfalls zu vernachlässigende Menge.

Es enthielt die Pflanze also auch in diesem Entwicklungszustand noch ihr Samenglykosid in unveränderter Menge und Zusammensetzung¹⁾.

4. Stadium. Das erste Laubblattpaar ist entwickelt, das zweite als Knospe vorbereitet. Dieses erste Laubblattpaar zeigt schon die charakteristischen Gliederhaare in

¹⁾ Auffallend ist der starke Sturz im Fettgehalt. Vielleicht hängt er damit zusammen, daß hier Humus- und nicht mehr Wasserkultur angewandt wurde. Doch kommt ähnlicher kritischer Sturz auch sonst vor. Czapek, Biochemie d. Pflanze, 1, 128. Ricinussamen. Jedenfalls fällt bei meinen Versuchen der Fettschwund mit dem einsetzenden wirklichen Wachstum des Trockensubstanz zusammen.

reichlicher Entwicklung (Fig. 4). Das Stadium ist nach 48 Tagen erreicht.

Zur Untersuchung 800 Pflanzen entsprechend einem Samentrockengewicht von 0,0166 g.

Feuchtgewicht der Ernte 1,95 g (zu groß, da die Wurzeln etwas Erde enthalten).

Trockengewicht (richtig) 0,169 g; also $< 8,6\%$ Trockensubstanz, $91,4\%$ Wassergehalt.

Petrolätherextrakt 0,011 g; also $6,5\%$ der Trockensubstanz; der Petrolätherextrakt enthielt alles Chlorophyll.

Vermehrung der Trockensubstanz durch Wachstum um das 10,2fache.

Die Auswertung ergibt in der Kaltwasserfraktion 73,4 F. D.

Davon gehen durch Ausschütteln in Chloroform ab 35 F. D. (Gitalin)

und verbleiben in der wäßrigen Lösung 38,4 F. D. (Digitalinum verum oder Digitalein).

Nach den gewählten Versuchsbedingungen ist die Unterfraktion: Chloroformausschüttelung des Kaltwasserextraktes zum allergrößten Teil wirklich Gitalin.

Insgesamt enthalten die 300 Pflanzen 0,0004 g wasserlösliches Aktivglykosid, auf Trockensubstanz gerechnet = $0,26\%$.

Der Alkoholextrakt der vorher mit Wasser erschöpften Blätter lieferte 22 F. D. Digitoxin (Titer 0,00000365) oder $0,00008\text{ g} = 0,05\%$.

Gesamtglykosidmenge der Pflanze demnach $0,31\%$.

Die Samen der geernteten 300 Pflanzen enthielten 0,000395 g Glykosid nach der Berechnung, in der Ernte wurden gefunden 0,00052 g, also eine Glykosidvermehrung von 0,00013 g oder 33% . Die Vermehrung der Trockensubstanz betrug etwa 0,152 g oder 1000% , auf diesen Zuwachs kommen 0,00013 g Aktivglykosid oder $0,085\%$. Der Gesamtglykosidgehalt der ausgewachsenen zweijährigen Blätter beträgt 1% , die neugewachsene Substanz hat also in diesem Entwicklungsstadium noch ein geringes Vermögen, Aktivglykoside zu bilden.

Bezüglich der Bildung der Blattglykoside ist in diesem Stadium der Wendepunkt für die Pflanze, denn hier zum ersten Male sind die spezifischen Substanzen Gitalin

und Digitoxin aufgetreten. Das Stadium charakterisiert sich als das der ersten Laubblätter mit ihren morphologischen Merkmalen. Es ist also nur der Stoffwechsel dieser Blätter, der zur Blattglykosidsynthese geeignet ist, bis dorthin war in den Keimblättern, obwohl auch diese an Masse zunahmten und Chlorophyll gebildet hatten, nur das im Samen vererbte Samenglykosid enthalten, daraus ist zu schließen, daß die Synthese der Blattglykoside von der Chlorophyllfunktion unabhängig ist.

5. Stadium. Entwickeltes zweites Laubblattpaar. Das erste Laubblattpaar ist weitergewachsen, das zweite zu schon ansehnlicher Größe entwickelt (Fig. 5). Die Pflanze ist 62 Tage alt.

Zur Untersuchung 100 Pflanzen entsprechend einem Samentrockengewicht von 0,0055 g.

Feuchtgewicht der Ernte 2,69 g.

Trockengewicht derselben 0,270 g, also 9,6% Trockensubstanz.

Petrolätherextrakt 0,0088 g oder 3,2%.

Der Petrolätherextrakt enthielt kein Chlorophyll, wahrscheinlich weil ein Petroläther anderer Zusammensetzung verwendet wurde. Im Stadium 4 war alles Chlorophyll mit extrahiert, daher dort der prozentisch höhere Extraktgehalt.

Die Zunahme der Trockensubstanz erreicht in diesem Zustand das 48fache der gesäten Menge.

Die Auswertung ergibt:

Gesamter Kaltwasserextrakt 140 F.D. davon

Gitalinfraktion 60 F.D. oder 0,0003 g = 0,112%

Digitalein 80 F.D. oder 0,00048 g = 0,178%

Digitoxin 21 F.D. oder 0,00007 g = 0,092%

Gesamtglykosidgehalt der Pflanzen 161 F.D. oder 0,00085 g = 0,292%

Gegenüber dem vorigen Stadium ergibt sich ein zu vernachlässigender Mindergehalt an Glykosiden; auch die qualitative Zusammensetzung ist die gleiche, so daß man sagen kann, daß vom Momente der Entwicklung der Laubblätter die Digitalispflanze hinsichtlich ihres qualitativen Chemismus erwachsen ist, nur die Ausbeuten

bleiben noch hinter den Werten der vollentwickelten Pflanze zurück. Es ist aber auch zu bedenken, daß die untersuchten Blätter auch als Laubblätter noch sich weiter strecken und an Maß zunehmen.

6. Einige ältere Stadien¹⁾ teile ich im folgenden kurz mit. Die Messungen stammen von anderem Material und sind zu anderen Zwecken angestellt.

1. Alter	Kaltextrakt Gesamtglykoside	Digitoxin	Wassergehalt
85 Tage	0,5%	0,07%	91%
132 „	0,7%	0,2%	85%

Die Werte der Glykoside beziehen sich auf exsiccator-trockenes Material. Nach vielen Trockenbestimmungen beträgt der Trockengehalt völlig erwachsener zweijähriger Pflanzen im Durchschnitt 15%, nach ihm kann also die 132 Tage alte Pflanze als erwachsen gelten. Das ist sie auch nach ihrem Gehalt an Glykosiden, nämlich 0,9%, mit dem sie den Gehalt der von zweijährigen Pflanzen stammenden Folia titrata des Handels (1,0%) nahezu erreicht.

Der Chemismus der Pflanze, der in qualitativer Hinsicht, mit Entwicklung des ersten Laubblattpaares festgelegt ist (48 Tage), erreicht mit 132 Tagen das Maximum seiner quantitativen Ausbeute. In diesem letzteren Stadium haben die ersten 2 bis 3 Paare von Laubblättern ihre maximale Größe erreicht und sterben dann ab. Man kann also annehmen, daß das Wachstum der spezifischen Blattglykoside dem Blattwachstum selbst direkt proportional ist und mit einer Menge von ca. 1% der Blattdrockensubstanz sein erreichbares Maximum hat.

Daraus wird man auch den wahrscheinlichen Schluß ziehen müssen, daß irgendeine physiologische Bedeutung den Digitalisglykosiden nicht zukommt, man wird sie bis zum Beweis des Gegenteils als Nebenprodukte des besonderen Blattstoffwechsels, und zwar des Wachstumschemismus, bezeichnen müssen.

¹⁾ Entnommen einer Untersuchung von Dr. E. Meyer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 1917 (im Druck).

Tabelle I.
Gewichte pro einzelne Pflanze.

	Luft-trocken	Absolut trocken	Trocken-substanz in %	Wachs-tum der Trocken-substanz	Fettgehalt (Petroläther) der Trocken-substanz	% Dig-verum	% Gi-talin auf Trockensubstanz	% Digi-talein	% Digi-toxin	Summe	Alter Tage
Samen	0,061 mg	0,055 mg	91	0fach	42,5%	2,39	—	—	—	2,39	0
Radicula	0,20 "	0,06 "	30	0 "	33%	2,38	—	—	—	2,38	19
Keimblatt	0,39 "	0,06 "	15	0 "	32%	2,18	—	—	—	2,18	27
1. Laubblatt	1,84 "	0,19 "	14	3,8 "	3,4%	2,56	—	—	—	2,56	33
Knospe											
2. Laubblatt	6,5 "	0,57 "	8,7	10 "	6,5% ¹⁾	—	0,13	0,13 ²⁾	0,05	0,31	48
Knospe											
2. Laubblatt entwickelt	26,0 "	2,7 "	9,6	48 "	3,2%	—	0,112	0,178	0,02	0,29	62

¹⁾ Inkl. das gesamte Chlorophyll.

²⁾ Die Annahme Digitalin ist willkürlich und nur deshalb gemacht, weil durch den Gehalt an Gitalin und Digitoxin das Gemenge Blätterglykosidcharakter hat.

Ebensowenig werden den Glykosiden des Samens, die ja nur in den Keimblättern bleiben, Arbeitsfunktionen für die wachsende Pflanze zukommen, bei denen die verbraucht werden, denn das geschieht eben nach meinen Untersuchungen nicht.

Ergebnisse.

Die spezifischen Glykoside des Digitalissamens sind kein Reservematerial; sie gehen in die Keimblätter über, werden nicht verbraucht, wachsen aber auch nicht weiter. Die Blattglykoside entstehen schon in den ersten Laubblättern. Sie wachsen an Quantität mit diesen bis zu einem Gehalt von etwa 1% der Trockensubstanz.

Das Verschwinden des Samenfettes, die Bildung des Chlorophylls sind phytochemische Vorgänge, die mit der Glykosidsynthese nichts Direktes zu tun haben.

Die Glykoside scheinen lediglich Abfallprodukte des Wachstumstoffwechsels der Pflanze zu sein.

Die ziffernmäßigen Ergebnisse der Versuche sind in der Tabelle zusammengestellt.

Erklärung zu den Abbildungen auf Tafel 1—3.

Fig. 1. Tontellerkultur von 27 Tagen Alter und 1622 Exemplaren; der ganze Rasen läßt sich zur Untersuchung leicht abheben und ganz quantitativ gewinnen. Die schwarzen Punkte des Grundes sind Algen.

Fig. 2. Ein Teil dieser Kultur in etwa 5facher Vergrößerung. Die Keimblätter sind schon intensiv grün.

Fig. 3. Humuskultur von 33 Tagen. Keimblätter voll entwickelt, erstes Laubblattpaar angedeutet.

Fig. 4. Erstes Laubblattpaar entfaltet, man beachte die charakteristischen Gliederhaare. Zweites Laubblattpaar als Knospe. Alter 48 Tage.

Fig. 5. Zweites Laubblattpaar entwickelt. *k, k₁* die beiden Keimblätter, *L₁* das erste, *L₂* das zweite Laubblattpaar. Alter 62 Tage. Maßstab für Fig. 2 bis 5 = 1 cm.

Notiz über Vorläufer der Methode von Kjeldahl zur Bestimmung des Stickstoffs.

Von

E. Salkowski.

(Eingegangen am 22. März 1917.)

Es ist eine nicht seltene, trotzdem aber interessante Erscheinung, daß neu auftauchende Ideen, die leicht zu vervollständigen wären, unbeachtet bleiben, dann aufs neue gefunden werden und weiter ausgebaut die größte Verbreitung finden. Dieses gilt bis zu einem gewissen Grade für das Kjeldahl-Verfahren.

In der 4. Auflage seines Handbuches der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse (1875) beschreibt Hoppe-Seyler, S. 322 u. 323, ein Verfahren nach Heintz und Ragsky zur Bestimmung des Harnstoffs durch Wägung. Es heißt daselbst:

„Man mißt von dem Harn je nach seiner Konzentration 2 bis 5 ccm möglichst genau in eine nicht zu kleine Porzellan- oder Platinschale ab, fügt etwa das gleiche Volumen reine Schwefelsäure hinzu und erhitzt nun bis 180° und 200° auf dem Sandbade, indem man die Schale bedeckt hält, solange feinblasiges Aufschäumen stattfindet und bis schweflige Säure entweicht. Nach dem Erkalten gießt man die rückständige Flüssigkeit in das etwa drei- oder vierfache Volumen destilliertes Wasser, filtriert, wenn sich Kohle abgeschieden hat, fügt Platinchlorid hinzu, solange Niederschlag entsteht und bis die Flüssigkeit durch ihre Farbe deutlich zeigt, daß sie überschüssiges Platinchlorid enthält, läßt 12 Stunden bedeckt stehen, sammelt den Niederschlag auf gewogenem Filter, wäscht mit Spiritus gut aus, trocknet Filter und Niederschlag bei 100° und wägt nach dem Erkalten über Schwefelsäure.“

Der gewogene Niederschlag besteht aus Kaliumplatinchlorid und Ammoniumplatinchlorid, das teils aus präformiertem Ammonsalz, teils aus dem Ammoniak stammt, welches aus den N-haltigen Substanzen des Harns entstanden ist. Das Prinzip, „die Überführung des gesamten N in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durch Erhitzen mit Schwefelsäure“, ist also vorhanden. Daß Heintz und Ragsky das Ammoniak auf einem anderen Wege bestimmten, ist prinzipiell unerheblich. Es war nur ein Schritt bis zur Austreibung des Ammoniaks durch Destillation mit Natronlauge. Diesen Schritt haben Heintz und Ragsky nicht gemacht. Sie schlugen vielmehr einen umständlichen Weg ein, um zu erfahren, wieviel von dem gewogenen Niederschlag auf Kalium, wieviel auf präformiertes Ammonsalz zu beziehen ist.

„Man versetzt 20 ccm des Harns mit Platinchlorid, bis kein Niederschlag mehr entsteht und die Farbe der Flüssigkeit gelbrot geworden ist, läßt einige Stunden bedeckt stehen, sammelt das ausgeschiedene Kalium- und Ammoniumplatinchlorid auf einem kleinen gewogenen Filter, wäscht mit Spiritus gut aus, trocknet das Filter mit dem Niederschlag bei 100° und wägt.“ Heintz und Ragsky erfahren so also — wenn wir die Frage nach der Genauigkeit des Verfahrens hier beiseite lassen — den Gesamtstickstoff minus dem Stickstoff des präformierten Ammoniaks, ein Wert, der im Grunde genommen, wenig Interesse hat, richtiger wäre es jedenfalls gewesen, das Kalium zu bestimmen und in Rechnung zu stellen, freilich auch umständlicher.

Hoppe-Seyler sagt am Schluß:

„Berechnet man nun beide Platinniederschläge für 100 ccm Harn, zieht den ersten Niederschlag von dem zweiten¹⁾ ab, so erhält man das Ammoniumplatinchlorid, das der Harnstoff von 100 ccm Harn liefert, und diese Zahl multipliziert mit 0,13423, gibt dann den Prozentgehalt des Harns an Harnstoff.“

Es ist natürlich nicht anzunehmen, daß Hoppe-Seyler übersehen habe, daß ein Teil des Stickstoffs auch aus der Harnsäure, dem Kreatinin, der Hippursäure usw. stammt, es ist vielmehr selbstverständlich, daß Hoppe-Seyler hier Stickstoff

¹⁾ Hoppe-Seyler beschreibt an erster Stelle die direkte Fällung des Harns mit Platinchlorid.

der organischen stickstoffhaltigen Körper, umgerechnet auf Harnstoff meint. In einer etwas anderen, die Harnsäure berücksichtigenden Form beschreibt Heintz selbst sein Verfahren in seinem Lehrbuch der Zoochemie (1853).

Immerhin ist hier nur von einer quantitativen Überführung des Stickstoffes leicht zersetzbarer N-haltiger Substanzen in Ammonsulfat beim Erhitzen mit Schwefelsäure die Rede, nicht von einer gleichen Zersetzung von Eiweiß, es fehlt also noch ein großer Schritt.

Dieser Schritt ist in gewissem Sinne von E. A. Grete¹⁾ gemacht, der indessen an Stelle der Destillation mit Natronlauge Glühen mit Natronkalk anwendete, das ja an sich schon zur Bestimmung des Stickstoffs dient. Grete hatte auch nicht die Überführung allen Stickstoffs in Ammonsulfat im Auge; was er wollte, war, wie es scheint, eine zuverlässige Durchschnittsprobe zu erhalten. Inwieweit er sich dabei Kjeldahl genähert hat, geht am besten aus seiner eigenen kurzen Mitteilung: „Über die Bestimmung des Stickstoffs in organischen Substanzen“ hervor.

„Bei Gelegenheit einer Untersuchung von Hornabfällen und Wolle machte ich die Erfahrung, daß die Forderung einer weitgehenden Zerkleinerung²⁾ oft nur mit den größten Opfern an Zeit und Mühe genügt werden kann. Es schien mir daher wünschenswert, sich nach einer Methode umzusehen, die das gewünschte Ziel möglichst rasch und vollkommen erreichte. Von chemischen Mitteln mußte konz. Natronlauge ausgeschlossen werden, da sie während der Lösung zur Entwicklung einer kleinen Menge Ammoniak Veranlassung gab. Von ausgezeichnetem Erfolge war dagegen die Anwendung von konz. Schwefelsäure begleitet. Bekanntlich wird schon in Düngerfabriken die lösende Kraft der Schwefelsäure für organische Substanzen ausgenutzt, und ich fand, daß sie für die Zerkleinerung von Wolle, Garn, Leder usw. Vortreffliches leistet. Überschüssige Schwefelsäure wird durch Natronkalk leicht in Gips übergeführt, wodurch die Masse vollkommen trocken wird. So einfach diese Operation an und für sich ist, so erlangt sie dadurch eine weitergehende

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 11, 1598.

²⁾ Nämlich zum Zweck der Stickstoffbestimmung.

Bedeutung für die Untersuchung aller stickstoffhaltigen organischen Substanzen überhaupt, weil die Analysen, nach obiger Vorbereitung ausgeführt, gewöhnlich höhere Zahlen lieferten, was besonders für die Eiweißkörper von größter Wichtigkeit ist“

Für Grete war somit die Lösung des Untersuchungsmaterials in konzentrierter Schwefelsäure nur eine vorbereitende Operation, er hat nur konstatiert, daß dabei kein Stickstoff verloren geht, nicht aber daß der Stickstoff völlig in Ammonsulfat übergeht¹⁾. Dieses war lediglich für den Harnstoff und die leicht zersetzbaren stickstoffhaltigen Verbindungen im Harn von Heintz und Ragsky als selbstverständlich vorausgesetzt, vielleicht auch erwiesen.

So waren also schon vor Kjeldahl „Anläufe“ zu der nach ihm benannten Methode vorhanden; Kjeldahls Scharfblick aber blieb es vorbehalten, in der Einwirkung der Schwefelsäure auf stickstoffhaltige organische Verbindungen eine fast allgemein anwendbare, zur Bestimmung des Stickstoffs ausgezeichnet geeignete Reaktion zu erkennen, die namentlich der Biochemie und Agrikulturchemie unschätzbare Dienste geleistet hat und fortdauernd leistet.

¹⁾ Das hatte für ihn kein Interesse, da er ja doch nachträglich mit Natronkalk erhitzte!

Zur Frage der Säurewirkung beim Pflanzenfresser und Fleischfresser.

Von
E. Salkowski.

(Eingegangen am 22. März 1917.)

In ihrer Arbeit „Säurevergiftung und Luftverdünnung“¹⁾ sagen Loewy und Brahm:

„Bekanntlich unterscheiden sich hierbei (nämlich bei der Wirkung unverbrennlicher Säuren) die herbivoren Tiere von den carnivoren dadurch, daß, wie zuerst Salkowski vermutete und dann Walther experimentell bestätigte, erstere im wesentlichen fixes Alkali, letztere unter Schonung dieses Ammoniak hergeben.“ Ähnliche Äußerungen finden sich öfters in der Literatur. Obwohl sie zu einem wesentlichen Teil unrichtig sind, kann ich natürlich nicht jedesmal dagegen protestieren, diesmal aber habe ich besondere Veranlassung dazu und fühle mich zum Widerspruch verpflichtet, weil die Meinungsäußerung von angesehener Seite kommt, die ich von persönlicher Animosität gegen mich frei weiß — was nicht immer der Fall ist —, ich muß es zu meinem Bedauern tun, um nicht den Schein zu erwecken, als ob ich damit einverstanden sei.

Die Verfasser zitieren bei ihrem Ausspruch meine Arbeit in Virchows Archiv 58, 1, 1873. Sehen wir also zu, zu welchen Ergebnissen diese geführt hat.

Ich habe in derselben zunächst festgestellt, daß Kaninchen, die bei saurer Nahrung (Weizengraupe) sauren Harn entleerten, nach Fütterung mit Taurin bedeutend mehr Schwefelsäure ausschieden als an den taurinfreien Vortagen und fast das Dreifache an Alkali in Form von Salzen, natürlich hauptsächlich Sulfaten.

¹⁾ Diese Zeitschr. 79, 224.

Weiterhin habe ich in dem Harn von mit Weizengraupe gefütterten Kaninchen, die Taurin bekamen, sämtliche im Harn entleerten Säuren und Basen quantitativ bestimmt, den Bedarf der Säuren an Natrium zur Bildung normaler Salze berechnet (Phosphorsäure als H_2NaPO_4), andererseits die gefundenen Basen auf Natrium umgerechnet. Es ergab sich:

1. Erfordertes Natrium 0,721 g¹⁾, im Harn gefunden 0,745 g,
2. " " 0,8009 g, " " " 0,8691 g.

Die Kaninchen hatten also die aus dem Taurin entstandene Schwefelsäure durch Alkali abgesättigt, die sie von ihrem Körper hergegeben hatten.

Um zu sehen, ob dem Organismus fertig zugeführte Säuren dieselbe Wirkung hätten, wie im Organismus entstandene, führte ich weitere Versuche aus, in denen ich Kaninchen verdünnte Schwefelsäure in den Magen brachte und wiederum sämtliche Säuren und Basen im Harn bestimmte. Es ergab sich:

1. Erfordertes Natrium 1,2011 g, gefunden 1,1402 g,
2. " " 1,3635 g, " 1,1896 g²⁾.

Die eingeführte Säure ist also zum größten Teil durch von dem Körper hergegebenes Alkali neutralisiert worden. Ich halte diese Versuchsanordnung für absolut beweisend und kann mir keinen Einwand dagegen ausdenken. Somit habe ich die Alkalientziehung durch Säuren bei Kaninchen nicht vermutet, sondern bewiesen.

Nun das Verhältnis dieses Befundes zu den bisherigen Angaben! Hier will ich, um ganz objektiv zu verfahren, den Berichtstatter über meine Arbeit im Malyschen Jahresbericht³⁾, Richard Pribram, statt meiner sprechen lassen. Pribram sagt wörtlich:

¹⁾ Im Original steht infolge eines Druckfehlers 0,731; der Bedarf der unterschwefligen Säure an Natrium ist hierbei außer acht gelassen, weil die Bestimmungen derselben nicht einwandfrei sind; rechnet man sie schätzungsweise, so ergibt sich statt des Plus an Basen ein geringer Fehlbetrag.

²⁾ Weitere Versuche nach Säurezufuhr betreffen die Acidität des Harns und die etwaige Ausfuhr von Alkalien durch die Kotentleerungen dabei.

³⁾ Bericht für 1873, 3, 138.

„Die Frage, ob es möglich sei, dem lebenden Organismus einen Teil seines Alkalis zu entziehen, ist durch ältere unter Buchheims Leitung von Eylandt und Wilde angestellte Versuche für den Menschen, durch neuere Versuche von F. Hofmann¹⁾ für die Taube und von Gaethgen²⁾ für den Hund im negativen Sinne beantwortet worden.“

Es ist also, wie vorstehende Zeilen zeigen, auch nicht einwandfrei, wenn Loewy und Brahm sagen: „Die älteste Anschauung bezeichnete als Säurevergiftung alle Zustände, bei denen unverbrennliche Säuren oder saure Salze in gegen die Norm vermehrter Menge im Körper vorhanden sind und, durch Alkali neutralisiert, zu einer Steigerung der Alkaliausfuhr durch den Harn führen.“

Ich wüßte nicht, worauf diese „ältesten Anschauungen“ beruhen sollten. Soweit ich die Literatur kenne, hat sich vor Buchheim überhaupt niemand den Kopf darüber zerbrochen, was aus zugeführten, nicht oxydierbaren Säuren im Organismus wird.

Nach dem Ergebnis meiner Versuche an Kaninchen und den zu jener Zeit darüber vorliegenden Angaben über das Verhalten der Säuren beim Hunde war ich durchaus berechtigt, die Alkalientziehung durch Säuren als einen den Organismus des herbivoren Tieres kennzeichnenden Vorgang im Gegensatz zu den Carnivoren anzusehen. Es kann gegen meinen Anspruch, dieses „nachgewiesen“, nicht „vermutet“ zu haben, nicht eingewendet werden, daß ich in meiner Arbeit auch ältere nicht beweiskräftige Versuche erwähnt habe, durch die nachgewiesen sein soll, daß auch beim Menschen durch Säuren, namentlich im Organismus entstandene, Alkali entzogen sein soll, denn ohne Zweifel kann ja durch ein Übermaß von Säuren dieser Effekt sowohl beim Menschen als auch beim Hund erreicht werden.

Daß bei Carnivoren möglicherweise zur Neutralisation der Säure Ammoniak dienen könne, habe ich nur als eine Vermutung ausgesprochen, die von Schmiedeberg und Walther als tatsächlich bestehend nachgewiesen wurde. Nach dieser

¹⁾ Malys Jahresber. 1, 90, 1871.

²⁾ Malys Jahresber. 2, 200, 1872.

Richtung habe ich aber niemals irgendwelche Ansprüche erhoben¹⁾.

Im übrigen verweise ich bezüglich der historischen Entwicklung der Frage der Alkalientziehung auf meine kürzlich in der Berl. klin. Wochenschr. 1917, Nr. 10, erschienene Mitteilung „Über die Bedeutung des Basen-Säureverhältnisses im Harn und die Ermittlung desselben.“ Sie steht in keinem Zusammenhang mit der Arbeit von Loewy und Brahm, es handelt sich vielmehr um ein zufälliges zeitliches Zusammentreffen.

¹⁾ Selbst konnte ich keinen Versuch darüber anstellen, weil das Laboratorium, als ich es Oktober 1872 übernahm, nicht auf Stoffwechselversuche an Hunden eingerichtet war.

Der Begriff „Nährwert“.

Von

Rudolf Höber.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 23. März 1917.)

Unter dem Titel: „Über die Zulässigkeit der Calorie als physiologische Maßeinheit“ veröffentlichte Carl Oppenheimer¹⁾ soeben eine Abhandlung des Inhaltes, daß es theoretisch falsch sei, den Wert der Nahrungsstoffe für den menschlichen Körper, wie üblich, durch die Größe der Wärmetönung ihrer Verbrennung auszudrücken; denn die Arbeitsfähigkeit des Körpers, die den Verbrauch der Nahrung garantiere, sei Ausdruck der freien Energie der Verbrennungsreaktionen und nicht ihrer Gesamtenergie; praktisch sei freilich mit der neuen Definition des Nährwertes durch den Arbeitswert nichts anzufangen.

Oppenheimer führt dies etwa so aus: der menschliche Körper ist vergleichbar nicht einer thermodynamischen, sondern einer chemodynamischen Maschine. Bei der ersteren kann die gesamte Verbrennungswärme des Feuerungsmaterials, in Calorien ausgedrückt, Maßstab des Brennstoff-Wertes für die Maschine sein, weil die Arbeit aus der Wärme entsteht und ihr proportional ist. Bei der letzteren jedoch, bei der die Arbeit direkt aus der chemischen Energie entspringt, ist die Größe der maximalen Arbeit ein von der Natur der reagierenden Stoffe abhängiger, sehr verschieden großer Bruchteil der Wärmetönung. Nun läßt sich freilich einerseits aus dem Nernstschen Wärmetheorem als wahrscheinlich herleiten, daß bei den Verbrennungsreaktionen des Körpers die Wärmetönung der maximalen freien Energie annähernd gleich ist. Auf der anderen Seite muß

¹⁾ C. Oppenheimer, diese Zeitschr. 79, 302 (1917).

aber, bei der Irreversibilität der meisten Organfunktionen, die wirklich auftretende Arbeit hinter ihrem theoretischen Maximum mehr oder weniger weit zurückbleiben. Bei dieser Sachlage könnte den Nahrungsstoffen ein verschiedener Wert nur noch insofern zukommen, als für jeden einzelnen Nahrungstoff die wirkliche Arbeitsfähigkeit einen verschiedenen großen Bruchteil seiner maximalen Arbeitsfähigkeit ausmache. Dafür fehlen aber nach den gegenwärtigen Kenntnissen alle sicheren Anhaltspunkte. Oppenheimer kommt daher zu dem Schluß, daß „uns vorläufig ein Arbeiten mit dem theoretisch einwandfreien Maßstab der freien Energie keinen Vorteil bringt.“

Ich sehe mich nun veranlaßt, darauf zu verweisen, daß ich fast dieselben Überlegungen — und meines Wissens zum erstenmal — schon vor sechs Jahren in der 3. Auflage meiner „Physikalischen Chemie der Zelle und der Gewebe“ mitgeteilt habe. Da ich nach der Veröffentlichung von Oppenheimer annehmen muß, daß dieselben nicht allgemeiner bekannt geworden sind, so sei es erlaubt, einen Teil derselben hier nochmals in der Fassung, die ich ihnen in der 4. Auflage meines Buches (S. 753, 1914) gegeben habe, zu veröffentlichen.

Der Begriff „Nährwert“. In der Normierung für eine möglichst günstige Beschaffenheit der zu Leistungen befähigten Protoplasten, so wie sie eben angegeben wurde, könnte vielleicht eine neue Definition für das gefunden werden, was man gewöhnlich als „Nährwert“ der Stoffe bezeichnet, eine Definition, die etwa lauten würde: Der Nährwert ist durch die, bei der Umwandlung zur Disposition gestellte maximale Arbeit bestimmt. Wir wollen diese Definition kurz auf ihre Brauchbarkeit prüfen, um so mehr, als ja eine brauchbare Fassung des Begriffes Nährwert so wie so noch aussteht. Denn sicherlich kann man heute nicht ohne weiteres den Satz gelten lassen, der in ähnlicher Fassung häufig in der Literatur wiederkehrt, daß „der Begriff „Nährwert“ nahezu identisch mit dem Begriff „Calorienwert“ geworden ist, der als grundlegender Maßstab für die Wertschätzung eines Nahrungsmittels gilt“. Denn daraus würde folgen, daß erstens die „isodynamen“ Mengen der verschiedenen Nahrungsstoffe für die Leistungsfähigkeit im weitesten Sinne des Wortes einander gleichwertig sind, und daß zweitens die Protoplasten nach Art der Dampfmaschinen

arbeiten, d. h. die Gesamtenergie des Nähr-, resp. Feuerungsmaterials erst in Wärme umwandeln und dann aus dieser Wärme ihren Aufwand an äußerer Arbeit bestreiten. Aber das erste läßt sich heute nicht beweisen, weil uns für die vielen Einzelmaschinerien, aus denen ein Organismus sich zusammensetzt, um so mehr für den Gesamtorganismus vorläufig jeder Maßstab der Leistungsfähigkeit fehlt, das zweite ist, wie wir noch sehen werden, durchaus unwahrscheinlich.

Die neue Definition für den Nährwert könnte also zunächst wohl mindestens als gleichberechtigt neben die genannte und oft gebrauchte Caloriendefinition gestellt werden; aber einen Fortschritt bringt sie nicht. Denn wenn wir auch nach den Berechnungen auf Grund des Nernstschen Wärmetheorems die Annahme machen, daß die freie Energie der Verbrennungsreaktionen sehr groß, nämlich ungefähr gleich der Wärmetönung ist, so wissen wir doch nicht, inwieweit die Arbeit leistenden Maschinerien im Organismus isotherm und reversibel funktionieren. Denn sobald diese Systeme nicht isotherm und reversibel wirken, wandelt sich eben ein größerer oder kleinerer Bruchteil der freien Energie in Wärme um. Ferner: wäre die freie Energie der physiologisch in Betracht kommenden Verbrennungen der Hauptnährstoffe gleich ihrer Wärmetönung, so brauchten doch nicht calorisch gleichwertige Mengen „isodynam“ zu sein, d. h. bei der Verbrennung in einem bestimmten Organ gleich viel freie Energie herzugeben, also das Organ gleich leistungsfähig zu machen; denn die Verbrennungen in den Organen erfolgen stufenweise, und wenn auch nach dem zweiten Hauptsatz die maximale freie Energie unabhängig von dem Weg ist, auf dem die Reaktion abläuft, so gilt das doch nur für den isotherm-reversiblen Verlauf, und wenn diese Bedingung nicht erfüllt ist, so kann natürlich die eine Reaktionsstufe mit größerem, die andere mit geringerem Verlust an freier Energie durchlaufen werden. Darüber aber, daß die arbeitenden Organe sich mehr oder weniger irreversibel betätigen, darüber kann natürlich kein Zweifel bestehen. Denn betrachten wir als nächstliegendes Beispiel allein etwa den Muskel, so bedeutet jede sogenannte statische Arbeit desselben, jeder Tetanus, jede isometrische Zuckung einen Verlust an freier Energie. Daß die Verhältnisse in andern Fällen nicht besser liegen,

ist höchstwahrscheinlich, wenn man bedenkt, wie selten sich überhaupt reversible Prozesse realisieren lassen.

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß die versuchsweise eingeführte Definition des Nährwertes durch die freie Energie des Nährmaterials uns vor allem deshalb nicht fördert, weil wir über den Grad ihrer Ausnutzbarkeit nichts wissen. Aber die Definition ist auch aus einem anderen Grunde unzureichend. Bei einer idealen technischen Maschine, die jeden Arbeitsverlust vermeidet, — also nicht, wie die heutige Maschine der Technik (abgesehen vom Akkumulator), auf Kosten der Verbrennungswärme arbeitet, sondern direkt die chemische Energie des Brennmaterials in Arbeit verwandelt, — dürfte man allerdings den „Nährwert“ des Feuerungsmaterials unbedingt der freien Energie seiner Verbrennung gleichsetzen. Bei den Organismen liegen aber die Dinge anders, wenigstens bei den höheren. Denn diese bedürfen als Warmblüter auf alle Fälle nicht bloß der freien, sondern auch der gebundenen Energie, der Wärme, die dem Maschinentechniker bloß ein unerwünschtes energetisches Nebenprodukt bedeutet, das er mangels besserer Konstruktionen mit in Kauf nehmen muß. Als geeignetstes Nährmaterial für einen Organismus wäre daher richtiger dasjenige zu bezeichnen, bei dem die ausnützbare freie Energie zu der gebundenen in einem ganz bestimmten, aber jetzt nicht näher angebbarem Verhältnis steht.

Anaphylaxiestudien.¹⁾

Ein Anaphylatoxin pflanzlichen Ursprungs.

Von
M. Loewit.

(Aus dem Institute für experimentelle Pathologie der k. k. Universität
Innsbruck.)

(Eingegangen am 26. März 1917.)

Mit 8 Figuren im Text.

Eine gelegentlich gemachte Beobachtung, daß ein Extrakt aus Weizenkleie bei Meerschweinchen nach intravenöser bzw. intraarterieller Injektion typische anaphylaktische Erscheinungen auszulösen vermag, wurde der Ausgangspunkt der folgenden Untersuchung, durch die sich die Möglichkeit darbot, dem chemischen Charakter eines Giftes mit anaphylaktischen Wirkungen nähertreten zu können. Nach mannigfachen und zeitraubenden Vorversuchen wurde die folgende Methode verwendet: 10 g einer fein gemahlene Weizenkleie²⁾ wurden mit 100 ccm 0,9%iger Kochsalzlösung bei 38° im Thermostaten während 24 Stunden extrahiert³⁾ und hierauf durch ein Tuch kolliert. Der Rückstand am Tuche wird in der gleichen Weise nochmals mit 100 ccm frischer Kochsalzlösung behandelt. Beide Flüssigkeiten von trüber, milchiger Beschaffenheit werden zunächst zentrifugiert, dann durch Papier filtriert bzw. gesaugt, miteinander vereinigt und ergeben eine gelbe, klare Lösung von eigenartig saurem Geruch und stark saurer Reaktion gegen Lackmus. Diese bei-

¹⁾ Frühere Mitteilungen (z. T. in Gemeinschaft mit G. Bayer und mit v. Worzikowsky-Kundratitz) befinden sich im Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **65**, **68**, **69**, **73**, **74**, **77**.

²⁾ Es wurde bisher immer nur eine Kleie der gleichen Provenienz untersucht.

³⁾ Extrakte mit destilliertem Wasser geben weit schwächer wirksame Lösungen.

den vereinigten Extrakte werden am Wasserbade bei 70 bis 80° auf 30 bis 40 ccm eingeengt und bilden in diesem Zustande (als Rohextrakt oder Rohgift) den Ausgang für die weitere Untersuchung.

Die Wirkung dieses Rohgiftes bei neutraler bzw. schwach alkalischer Reaktion nach intravenöser bzw. intraarterieller Injektion von 1 bis 2 ccm auf Blutdruck und Atmung von Meerschweinchen geht aus der Fig. 1 hervor, die in der üblichen Weise aufgenommen wurde und in jeder Beziehung die volle Übereinstimmung mit der typischen anaphylaktischen Vergiftung beim Meerschweinchen ergibt¹⁾. Im besonderen sei auf die in der Blutdruckkurve unmittelbar an die Giftinjektion anschließenden Vaguspulse, ferner auf die nur langsam abklingende Herztätigkeit, auf das rasche Sistieren der Tracheal- atmung (Kurve *Tr*), sowie auf die die Tracheal- atmung lang überdauernde krampfartige Bauch- und Brustatmung (Kurve *Th*, In- und Expirationsstöße) aufmerksam gemacht. Die künstliche Ventilation (mit dem großen Heringschen Respirationsapparat) gelingt erst bei Hubhöhe 9 (in der Reproduktion kaum kenntlich an der *Th*-Kurve), was auf einen intensiven Bronchospasmus hinweist; diese sowohl als auch die anderen in den früheren Arbeiten gekennzeichneten Organveränderungen wurden durch die Sektion und durch die mikroskopische Untersuchung sichergestellt. Die Gerinnung des am Ende des Choks untersuchten Blutes ist verzögert (nach 12 bis 25 Minuten), eine Ungerinnbarkeit desselben besteht jedoch nicht, worauf noch zurückzukommen sein wird²⁾. Bei allen Tieren stellte sich im Chok unwillkürlicher Harn- und Kotabgang, sowie heftige Körpermuskel- und Atemkrämpfe ein. Bei der stets vorgenommenen Sektion fällt die hochgradige Hyperämie im Splanchnicusgebiet und in der Leber auf, im Herzen und Zwerchfell konnten stets punkt- bzw. flächenförmige Blutungen nachgewiesen werden; Lungenödem war in einzelnen Fällen nachweisbar, namentlich wenn das Gift etwas

¹⁾ Vgl. Loewit, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 68, 83, 1912.

²⁾ Versuch vom 3. XII. 1914. Meerschw. Nr. 3, 310 g erhält iv. 0,75 ccm des dialysierten und auf 30 ccm eingeengten Rohgiftes (neutralisiert). Sofortiger Chok. Das bei der Sektion dem Herzen entnommene Blut zeigt in vitro nach 15 Minuten Wandgerinnung, nach 25 Minuten totale Gerinnung. Gerinnungszeit normal 7 bis 12 Minuten.

stärker alkalische Reaktion besaß, dagegen waren die stets ballonierten Lungen in der Regel hyperämisch und oft von punkt- und flächenförmigen Blutungen durchsetzt.

Zur weiteren Isolierung des wirksamen Bestandteiles dieses Rohextraktes wurde dasselbe zunächst der Dialyse durch die

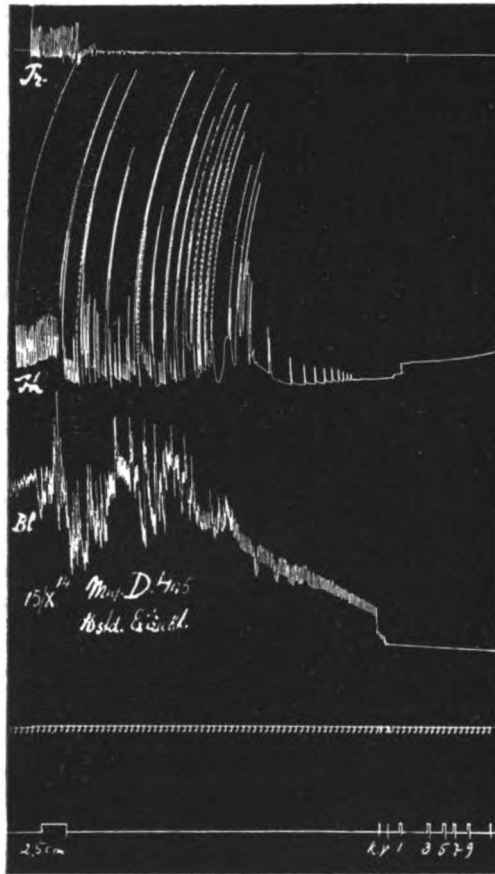


Fig. 1. Meersch. D, 405 g am 15. X. 1914. Die oberste Kurve (*Tr.*) entspricht der Trachealatmung aus einem geschlossenen Luftraum, die mittlere Kurve (*Th.*) der Bauchatmung (Mareysche Kapsel), die untere Kurve (*Bl.*) dem Blutdrucke in der *art. carotis* (Hg-Manometer), die vierte Linie der Zeitschreibung (je 5 Sek.) und gleichzeitig der Abszisse für den Blutdruck, die unterste Linie entspricht der Reizmarkierung. Bei der ersten Marke *iv.* Injektion von 2,5 ccm eines 16stündigen Kleienextraktes, die folgenden Markierungen geben die Hubhöhe der künstlichen Ventilation mit dem großen Heringschen Respirationsapparate an.

großen Pergamenthülsen (Schleicher und Schüll Nr. 579) während 48 Stunden im Thermostaten bei 38° unterzogen, nachdem ich mich überzeugt hatte, daß der wirksame Bestandteil des Rohextraktes dialysabel ist. Das Außenwasser wurde nach 24 Stunden erneuert, die beiden Dialysate wurden dann ver-

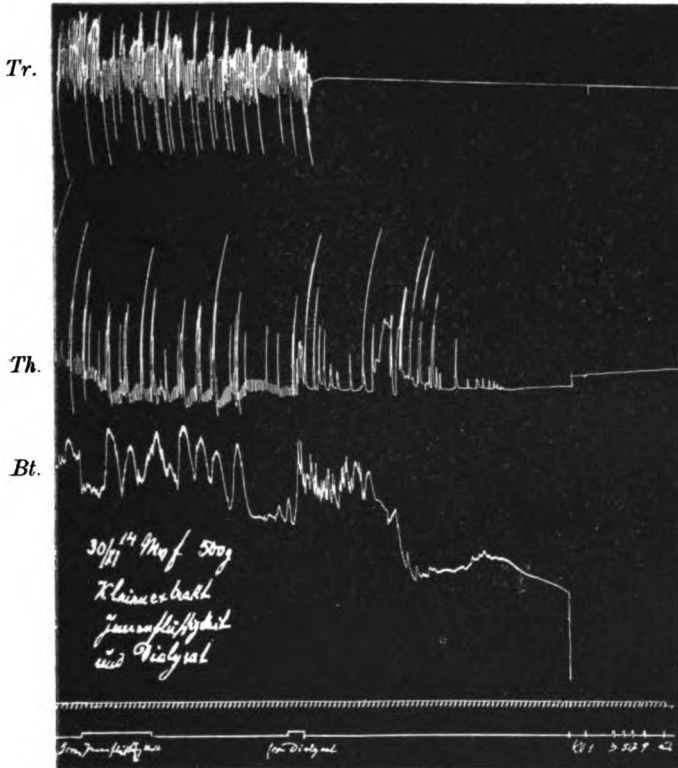


Fig. 2. Meersch. f, 500 g, am 30. XI. 1914. Die erste Marke auf der untersten Linie entspricht der iv. Injektion von 5 ccm Innenflüssigkeit aus der Dialysierhülse nach 48stündiger Dialyse, die zweite Marke jener von 1 ccm des eingengten Dialysates nach der gleichen Zeit. Die übrige Beschreibung wie in Fig. 1.

einigt, neuerdings auf 10 bis 20 ccm eingengt, besitzen gleichfalls stark saure Reaktion. Eine länger dauernde Dialyse ist nicht notwendig, da das dritte Dialysat sich in der großen Überzahl der Fälle giftfrei oder nur noch in sehr geringem Grade gifthaltig erwies. Der in der Fig. 2 wiedergegebene

Versuch stellt die Regel dar, er zeigt, daß nach zweimaliger Dialyse des Rohgiftes während 48 Stunden die Innenflüssigkeit in der Hülse ungiftig ist — 5 ccm derselben geben intravenös bei neutraler Reaktion eingeführt keine merkliche Wirkung —, während 1 ccm des eingengten und neutralisierten Dialysates die volle typische Giftwirkung wie die Ausgangsflüssigkeit zeigt (Fig. 2).

Das eingengte Dialysat läßt schwach positive Eiweißreaktion nach Spiegler¹⁾ und mit Sulfosalicylsäure²⁾ erkennen; die wirksame Substanz wird aus dem im Vakuum getrockneten Dialysat in Alkohol (Äthyl- und Methylalkohol) vollkommen aufgenommen, sie ist dagegen unlöslich in Äther, Chloroform, Benzol, Aceton, ist demnach kein Lipoid.

Das wirksame Gift ist ferner in der Weizenkleie nicht vorgebildet enthalten, da drei- und fünfstündige Extrakte, die von vornherein alkalische bzw. neutrale Reaktion besitzen, sich im Meerschweinchenversuch noch ganz unwirksam erweisen, 10 bis 16 stündige Extrakte aber bereits saure Reaktion und deutliche Wirkung erkennen lassen. Die wirksamen Extrakte zeigen eine reiche Bakterienflora, und es liegt der Gedanke nahe, daß das wirksame Gift in dem Extrakte durch bakterielle Spaltung pflanzlicher Eiweißkörper in demselben allmählich entsteht; es dürfte gelingen, den oder die in Betracht kommenden Mikroben in Reinkultur zu gewinnen. Es kann aber nicht von der Hand gewiesen werden, daß die allmähliche Entstehung des Giftes im Extrakt auf die Wirkung eines in der Weizenkleie vorgebildeten chemischen (eiweißspaltenden) Fermentes zurückzuführen ist, ähnlich wie im *Secale cornutum* die vier zyklischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Histidin und Tryptophan) durch fermentative (nicht durch bakterielle) Spaltung des Secaleiweißes entstehen, aus denen durch Decarboxylierung die zyklischen Aminobasen (Phenyläthylamin, Oxyphenyläthylamin, β -Imidazolyläthylamin Indoläthylamin) entstehen (Fraenkel und Rainer³⁾).

¹⁾ Vgl. S. Fränkel, Deskriptive Biochemie. Bergmann, Wiesbaden, 1907, 579.

²⁾ Vgl. Abderhalden, Abwehrfermente usw., 4. Aufl., Berlin, Springer, 1914, 322.

³⁾ Fraenkel und Rainer, Diese Zeitschr. 74, 167, 1916.

Von der Annahme ausgehend, daß die wirksame Substanz des Weizenkleienextraktes ein Eiweißabbauprodukt ist, wurde die weitere Isolierung des Giftes durch Fällung des eingeeengten Dialysates mit Phosphorwolframsäure versucht. Es gelang nun zwar der biologische Nachweis, daß die wirksame Substanz durch Phosphorwolframsäure niedergeschlagen wird, es konnte aber eine weitere Isolierung des Giftes in zahlreichen dahin gerichteten Versuchen nicht erzielt werden, was wahrscheinlich in den besonderen Fällungs- und Löslichkeitsverhältnissen der Phosphorwolframate von Mono- und Diaminosäuren begründet sein dürfte¹⁾.

Die Fällung mit Phosphorwolframsäure wurde auch von Hartoch und Ssirenski²⁾ angewendet, um in einem Falle nach einer langen (264stündigen) Verdauung von Pferdeserum mit dem pankreatischen Saft aus einer Duodenalfistel vom Hunde die chemische Beschaffenheit der für Meerschweinchen in diesem Falle tödlichen Substanz kennen zu lernen. Die Autoren beschränken sich darauf, festzustellen, daß nach dieser Zeit in dem Phosphorwolframniederschlag unter den etwa vorhandenen Polypeptiden die Leucin- und Tyrosingruppe höchstens in minimalen Mengen vorhanden war. Nach der langen Verdauungsdauer wird bereits ein tiefer Abbau des Eiweißmoleküls sowie ein kausaler Zusammenhang zwischen der Toxizität und dem Gehalte an freien Monaminsäuren vermutet. Es muß übrigens hervorgehoben werden, daß die bei den vergifteten Tieren geschilderten Symptome, darunter auch jene der geänderten Atmung, nur recht oberflächliche Beziehungen zu den diesbezüglichen Erscheinungen der Anaphylaxie darbieten.

Erst als die von Neuberg und Kerb³⁾ für die Fällung von Aminosäuren empfohlene Methode mit Mercuriacetat in schwach soda-alkalischer Lösung für den vorliegenden Fall angewendet wurde, wobei allerdings auch gewisse Albumosen (Hetero- und Protoalbumose) mitgefällt werden können (E. Zunz⁴⁾, konnte die Isolierung der wirksamen Substanz weiter verfolgt werden. Es konnte zunächst aus dem Quecksilberniederschlag nach Behandlung mit Schwefelwasserstoff eine Lösung gewonnen werden, die nach entsprechender Einengung quantitativ und

¹⁾ Vgl. P. Rona in Oppenheimers Handb. d. Biochemie, Jena, 1, 257, 1909.

²⁾ Hartoch und Ssirenski, Zeitschr. f. Immunf. 7, 253, 1910.

³⁾ Diese Zeitschr. 40, 498, 1912; 67, 119, 1914.

⁴⁾ E. Zunz, Travaux de l'Institut de Thérapeutique 11, 1912/13, Bruxelles 1913.

qualitativ die typische Giftwirkung im Meerschweinchenversuch wie die Ausgangslösung entfaltetete (Fig. 3).

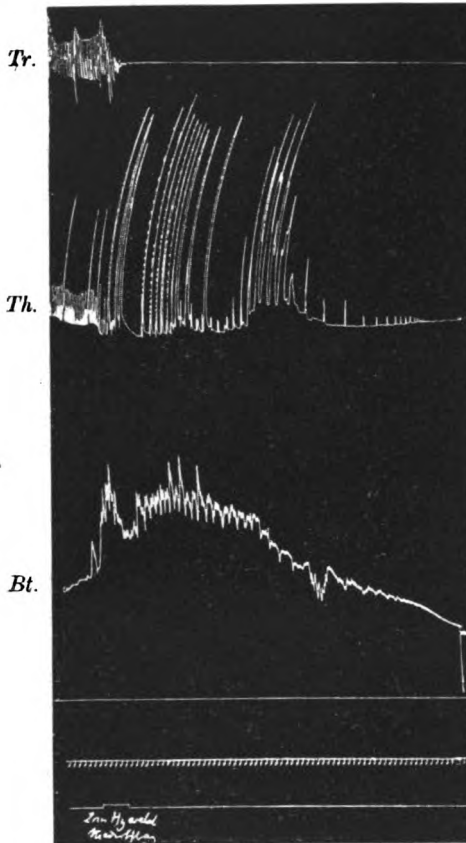


Fig. 3. Meerschw. Nr. 42, 370 g am 15. XII. 1914. Bei der Marke an der untern Linie wurden 2 ccm des gelösten und auf 20 ccm eingeeengten Mercuriacetatniederschlag aus dem Kleienextrakt-dialysate iv. injiziert. Die übrige Beschreibung wie in Fig. 1.

lon, Molisch, Adamkiewicz, Neubauer-Rohde³⁾ ergaben negatives Resultat. Der Ausfall dieser Proben weist auf die

Die weitere Spaltung dieser Lösung nach der Methode von Kossel und Kutscher¹⁾ in die Lysin-, Arginin- und Histidinfraktion ergab, daß die typische Giftwirkung nur mit der eingeeengten Histidinfraktion²⁾ erzielt werden kann (Fig. 4). Diese zeigte stets starke Diazoreaktion, so daß noch 3 bis 4 Tropfen der gereinigten und auf 10 bis 15 ccm eingeeengten barytfreien Histidinfraktion in 4 ccm H₂O eine deutliche Rotfärbung erkennen lassen. Es muß betont werden, daß die Innenflüssigkeit nach zweitägiger Dialyse stets noch starke Diazoreaktion zeigt. Die Spiegler- und die Sulfosalicylsäurereaktion in der eingeeengten Histidinfraktion fiel stets negativ aus, die Biuretprobe ist schwach, die Ninhydrinreaktion jedoch stark positiv; alle anderen Eiweißproben (Mil-

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 165, 1901.

²⁾ Zur Injektion wurden stets neutralisierte Lösungen verwendet.

³⁾ Diese Zeitschr. **44**, 161, 1905.

Anwesenheit von schwach biureten und die Ninhydrinreaktion deutlich gebenden Eiweißabbauprodukte in der Histidinfraktion hin. Nach dem negativen Ausfall der Millonschen Reaktion kann die Anwesenheit des Aminosäurederivates mit der Phenolgruppe (Tyrosin), nach dem negativen Ausfall der Reaktion von Neubauer und Rohde und von Adamkiewicz jene des Amino-

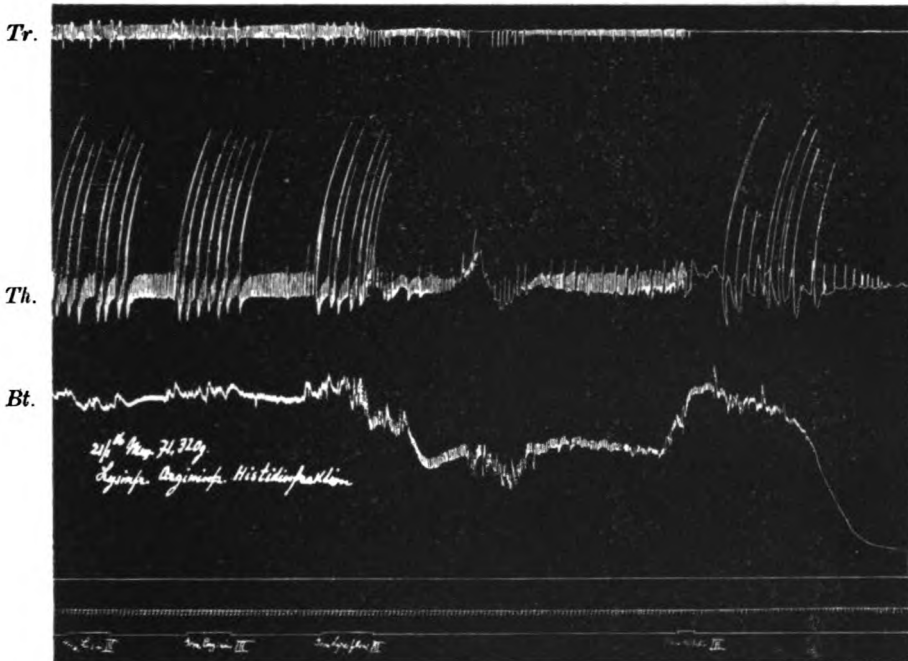


Fig. 4. Meersch. Nr. 71, 320 g, am 21. I. 1916. Bei der ersten Marke der untersten Linie wurden 4 ccm einer isolierten und auf 10 ccm eingengt Lysinfraktion aus dem Dialysate des Kleienextraktes III iv. injiziert; bei der zweiten Marke 4 ccm einer ebenso behandelten Argininfraktion III, bei der dritten Marke nochmals 3 ccm der gleichen Lysinfraktion III und bei der vierten Marke 1,5 ccm Histidinfraktion III des gleichen Extraktes. Die übrige Beschreibung wie in Fig. 1.

säurederivates mit der Indolgruppe (Tryptophan) mit Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, während der negative Ausfall der Molischprobe für das Fehlen der Aminozuckergruppe spricht. Der stets positive Ausfall der Diazoreaktion kann, ganz abgesehen von der Methode der Darstellung, als Anhaltspunkt für die Anwesenheit von Histidin bzw. Histamin angesehen werden,

dessen Imidazolnatur den positiven Ausfall der Diazoreaktion bedingt [Pauly¹), Fröhlich und Pick²)], womit auch die

positive Biuretreaktion in Übereinstimmung steht [Kossel und Edlbacher³)]. Unter gewissen Bedingungen wurde die Diazoreaktion geradezu zur quantitativen Histidinbestimmung empfohlen (Weiß und Ssobolew⁴), MaBlow⁵).

Bezüglich der Giftigkeit der Histidin- und der Ungiftigkeit der Lysin- und Argininfraktion ist hervorzuheben, daß das glatte, im Vorausgehenden geschilderte Resultat (Fig. 4) nur dann zu erwarten ist, wenn die Trennung dieser Gruppen eine vollständige, und die für die Tierinjektion verwendete Lösung völlig barytfrei ist. Es kann vorkommen, daß man gelegentlich auch mit der Argininfraktion Chokwirkungen am Meerschweinchen erzielt; in solchen Fällen gibt aber die Argininfraktion immer positive Diazoreaktion, ist also wahrscheinlich histidin-

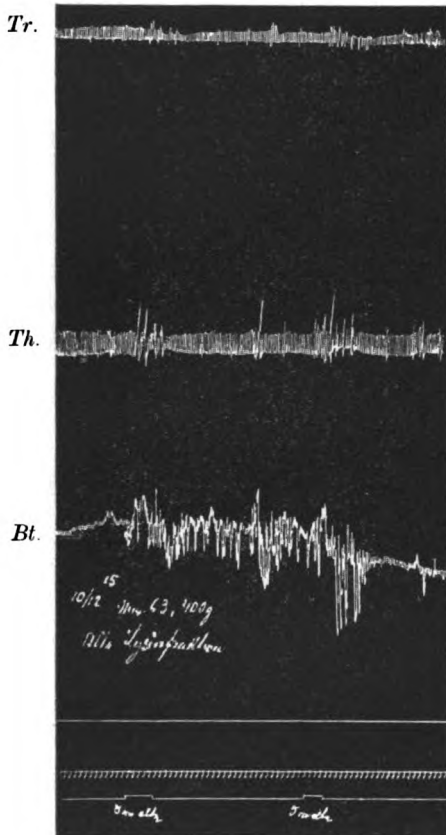


Fig. 5. Meerschw. Nr. 63, 400 g, am 10. XII. 1915. Bei den beiden Marken auf der untersten Linie wurden je 5 cm einer alten, lange gestandenen Lysinfraktion aus Weizenkleie iv. injiziert. Die übrige Beschreibung wie in Fig. 1.

¹) Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**, 508; **94**, 426, 1915.

²) Fröhlich und Pick, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **74**, 113, 1913.

³) Zeitschr. f. physiol. Chem. **94**, 396, 1915.

⁴) Diese Zeitschr. **58**, 119, 1914.

⁵) MaBlow, diese Zeitschr. **70**, 306, 1915.

bzw. histaminhaltig, während die unwirksame Arginin- und Lysinfraktion die Diazoreaktion stets vermissen läßt, wohl aber positive Biuret- und Ninhydrinprobe gibt.

Bezüglich der Ungiftigkeit der Lysinfraktion ist zu bemerken, daß auch barytfreie Lösungen, namentlich wenn man die Injektion wiederholt (Fig. 4), oder wenn man alte, längere Zeit gestandene Lösungen verwendet (Fig. 5), doch gewisse Giftwirkungen erkennen lassen, die sich namentlich durch das Auftreten von Vaguspulsen, Atemverlangsamung mit kürzeren expiratorischen Atempausen charakterisieren. Es sind aber diese Veränderungen immer nur vorübergehender Art und gleichen sich in der Regel rasch aus. Niemals tritt dabei Bronchospasmus, niemals Lungenblähung, niemals das allmähliche Absinken des Blutdruckes ein, welche Erscheinungen die Giftwirkung der Histidinfraktion so typisch hervorheben.

Die Frage nach dem wirksamen Bestandteile der Histidinfraktion kann vorläufig nicht mit Sicherheit beantwortet werden; das Histidin selbst, die Aminosäure, kann allerdings als das wirksame Gift ausgeschaltet werden. Sie wurde von verschiedenen Autoren unwirksam befunden (Ackermann¹), Dale und Laidlaw²), Barger und Dale³), Guggenheim und Löffler⁴), besitzt aber auch in kleinen Dosen ca. 0,0025 g für 100 g Körpergewicht auf Grund eigener Versuche⁵), auf die bei einer späteren Gelegenheit zurückzukommen sein wird, für Blutdruck und Atmung einen geringen Grad von Giftigkeit, die aber nicht jener der Histidinfraktion aus der Weizenkleie entspricht. Dagegen ruft das aus dem Histidin durch bakterielle Fäulnis bzw. durch Decarboxylierung hervorgehende Amin, das Histamin (β -Imidoazolyäthylamin) auch in kleinen Dosen Giftwirkungen hervor, die mit den anaphylaktischen Vergiftungserscheinungen, mit Ausnahme der verzögerten bzw. aufgehobenen

¹) Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 504, 1910.

²) Journ. of Physiol. **41**, 318, 1910.

³) Ebenda S. 499.

⁴) Diese Zeitschr. **72**, 303, 325, 1915.

⁵) Herr Prof. H. Fischer war so freundlich, mir zu diesem Zwecke ein von ihm dargestelltes reines Histidin zu überlassen, wofür ich auch an dieser Stelle meinen ganz besonderen Dank ausspreche.

Blutgerinnung, gut übereinstimmen (Dale und Laidlaw¹⁾, H. Pfeiffer²⁾). Die bestehenden bei einer andern Gelegenheit nochmals zu erörternden Differenzen können aber nicht als prinzipielle Unterscheidungsmerkmale angesprochen werden, da beispielsweise auch beim Meerschweinchen die verzögerte bzw. aufgehobene Blutgerinnung am Anfang des bereits voll entwickelten anaphylaktischen Chokes fehlt und sich erst später als sekundäre Erscheinung einstellt (Loewit³⁾). Die Verzögerung der Blutgerinnung und die Veränderung des Blutbildes fehlt auch bei der nach der Methode von Vaughan ausgeführten Vergiftung durch ein aus Hühnereiweiß oder Casein abgespaltenes Gift, das im übrigen typische anaphylaktische Vergiftungserscheinungen veranlaßt. Auch bei der durch Globin unter deutlich anaphylaktischen Erscheinungen bedingten Vergiftung tritt nach Schittenhelm und Weichardt⁴⁾ bei Meerschweinchen nur eine geringgradige Gerinnungsverzögerung auf, während das relativ ungiftige Nucleohiston und Nucleoproteid (aus Thymus) eine starke Hemmung der Blutgerinnung veranlaßt. Edmunds⁵⁾ hebt hervor, daß je nach der Darstellung des anaphylaktischen Giftes die Vergiftungserscheinungen nicht in allen Fällen völlig übereinstimmen müssen. Andererseits geben Hirschfeld und Klinger⁶⁾ an, bei anaphylaktischen Meerschweinchen und Hunden einige Male eine beschleunigte Gerinnung des Chokblutes beobachtet zu haben. Dazu kommt noch, daß auch das Histamin (La Roche) schwache, aber deutliche Ninhydrin-, Biuret- und deutliche Diazoreaktion gibt, und daß die Histidinfraktion aus Kleie bei der Katze die gleiche Blutdrucksenkung veranlaßt (Fig. 6), die Dale und Laidlaw⁷⁾ als Histaminwirkung bei diesem Tier beschreiben und abbilden. Auch beim Kaninchen (Fig. 7) treten nach intravenöser Zufuhr der Histidinfraktion aus Kleie jene rasch ablaufenden Veränderungen des Blutdruckes und der Atmung ein, die von mir⁸⁾ bei der anaphyl-

¹⁾ Dale und Laidlaw, a. a. O.

²⁾ H. Pfeiffer, Zeitschr. f. Immunf. 11, 140, 1911.

³⁾ Loewit, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 73, 4, 1913.

⁴⁾ Zeitschr. f. Immunf. 14, 97, 1912.

⁵⁾ Ebenda 17, 106, 1913.

⁶⁾ Ebenda 24, 199, 235, 1915.

⁷⁾ a. a. O. S. 322.

⁸⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 63, 103, 1912. Fig. 17.

aktischen Vergiftung des Kaninchens beschrieben wurden, und die auch von Dale und Laidlaw ¹⁾ bei der Histaminvergiftung des Kaninchens angeführt werden.

Die von Dale und Laidlaw, Barger und Dale u. a. betonte Analogie der Wirkung des Histamins und des anaphyl-

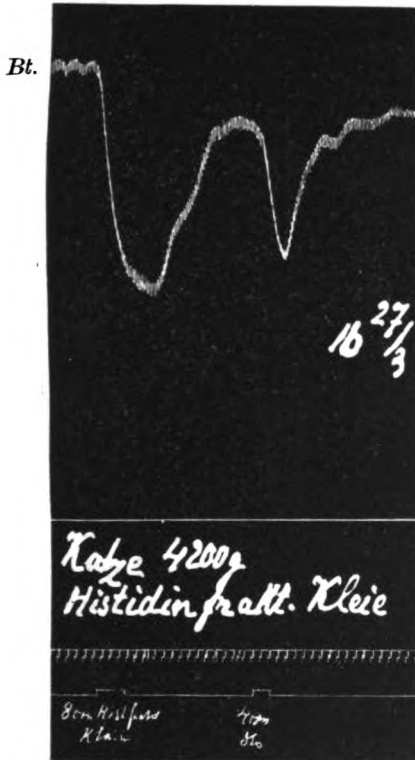


Fig. 6. Carotiskurve (Hg-Manometer) einer curaresierten Katze, 4200 g, mit zugehöriger Abszisse. Bei der ersten Marke auf der untersten Linie wurden 8 cm, bei der zweiten Marke 4 cm einer auf 10 cm eingengten Histidinfraktion von Weizenkleie IV iv. injiziert. Versuch vom 27. III. 1916.



Fig. 7. Carotiskurve (Bt, Hg-Manometer) und Tracheal-atmung eines Kaninchens, 550 g mit zugehöriger Abszisse. Bei der ersten Marke auf der unteren Linie wurden 5 cm Histidinfraktion aus Weizenkleie IV iv. injiziert. Versuch vom 2. VIII. 1916.

¹⁾ a. a. O., S. 331, Fig. 9.

aktischen Giftes kann zugegeben werden, der naheliegende Schluß aber, daß der anaphylaktische Chok durch Histaminvergiftung bedingt ist, kann indessen noch nicht als erwiesen angesehen werden¹⁾.

In der Histidinfraktion des Weizenkleieextraktes bzw. des Dialysates kann der Herstellungsart nach und auch auf Grund der chemischen und biologischen Reaktion Histamin enthalten und dann auch an der Vergiftung beteiligt sein. Die chemische Isolierung des Giftes konnte schon wegen der geringen Menge von Kleie, die zunächst verarbeitet werden konnte, vorläufig nicht durchgeführt werden, dagegen ist die Analogie der biologischen Wirkung des Histamins und des Kleieextraktes bzw. seiner Histidinfraktion ganz auffällig. Immerhin muß die Frage, ob das Histamin als der giftige bzw. als der allein giftige Bestandteil der Histidinfraktion des Kleieextraktes anzusehen ist, offen gelassen werden, zumal in der nach Kossel ausgefällten Arginin-Histidinfraktion noch andere wirksame Protamine bzw. Peptone und Albumosen teilweise mitgefällt werden²⁾, die vielleicht die gleiche biologische Wirkung im Tierversuch wie das Histamin besitzen können (Histaminwirkung).

Eine weitere Reinigung der barytfreien Histidinfraktion (aus Kleie) kann durch Zusatz einer 10%igen Lösung von Natriumbicarbonat vorgenommen werden. Der dabei zustandekommende feinflockige Niederschlag kann abfiltriert und gut mit Wasser gewaschen werden; er ist in verdünnter Essigsäure leicht löslich, gibt keine Diazoreaktion und ist nach intravasaler Zufuhr beim Meerschweinchen unwirksam, während die vom ausgefällten Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit noch schwache Diazoreaktion und nach intravasaler Injektion beim Meerschweinchen noch typischen Chok erkennen läßt, dessen Beurteilung allerdings durch gleichzeitig zustandekommendes starkes Lungenödem (Alkaliwirkung) beeinträchtigt ist, weshalb

¹⁾ Vgl. bei Friedberger und Langer, *Zeitschr. f. Immuf.* **15**, 528, 1912; ferner bei Loewit, *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **73**, 10f., 1913.

²⁾ Vgl. bei M. Siegfried, *Über partielle Eiweißhydrolyse. Die Biochemie in Einzeldarstellungen*, herausgeg. von A. Kanitz, Berlin, Bornträger, S. 18, 1916.

in der Regel von dieser Reinigung der Histidinfraktion Abstand genommen wurde.

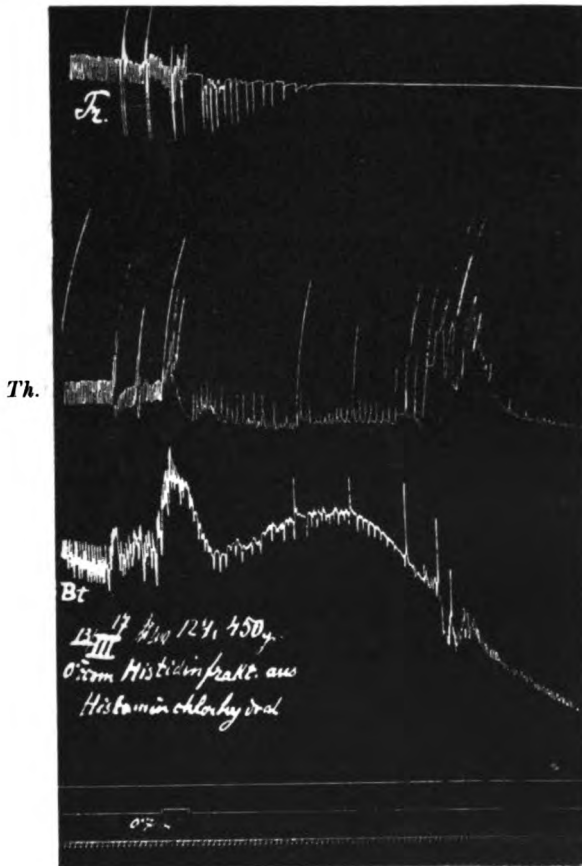


Fig. 8. Meersch. Nr. 124, 450 g, am 13. III. 1917. Bei der Marke der mittleren untern Linie wurden 0,7 ccm Histidinfraktion aus 2 ccm Histaminchlorhydrat 1:1000 (La Roche) in 40 ccm Wasser, auf 5 ccm eingengt, iv. injiziert. Die übrige Beschreibung wie in Fig. 1.

Die Frage, ob das Histamin überhaupt durch die Methode von Kossel und Kutscher gefällt wird und in welcher Fraktion dasselbe enthalten ist, wurde in der Weise untersucht, daß 2 ccm reines Histaminchlorhydrat 1:1000 (La Roche) in 40 ccm H_2O aufgenommen und nun nach der genannten Methode behandelt wurden. Die Histidinfraktion aus dieser Mischung

wurde schließlich auf 5 ccm eingengt und ergab bereits bei iv. Injektion von 0,70 ccm bei einem Normalmeerschweinchen die typische Chokwirkung (Fig. 8). Die Lysin- und Argininfraktion ergaben in der gleichen Konzentration keine Chokwirkung, nur vorübergehende Unregelmäßigkeiten der Herz- und Atemtätigkeit.

Zusammenfassung.

Es gelingt, mit Extrakten der Weizenkleie akute, tödliche anaphylaktische Vergiftungserscheinungen bei Meerschweinchen, Katzen und Kaninchen hervorzurufen. Die wirksame Substanz ist dialysierbar und kann in dem eingengten Dialysat in der Histidinfraktion nachgewiesen werden. Das Gift ist mit Wahrscheinlichkeit als ein Eiweißspaltprodukt mit Histaminwirkung (Histamin) aufzufassen, das in der Weizenkleie nicht vorgebildet sein dürfte; es kann vorläufig nicht entschieden werden, ob diese Wirkung auf die Anwesenheit eines oder mehrerer Eiweißbauprodukte zu beziehen ist.

Ergotoxin und Adrenalinhyperglykämie.

Von

Eric Laurin.

(Aus dem med.-chem. Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 27. März 1917.)

Mit 5 Figuren im Text.

Vor einigen Jahren hat Stenström¹⁾ in einer Arbeit aus dem hiesigen Institut Untersuchungen mitgeteilt, nach welchen die Adrenalinhyperglykämie und -glucosurie durch eine vorhergehende Injektion von Pituitrin vollständig gehemmt werden können. Es zeigte sich weiter, daß eine bestimmte Adrenalinquantität durch eine ganz bestimmte Menge Pituitrin neutralisiert wird, welche Quantität man sehr genau austitrieren kann. Die Hyperglykämie bildet dann den Indikator.

Nach Untersuchungen von Miculicich²⁾ läßt sich die Adrenalinglucosurie ferner auch durch Injektion von Ergotoxin unterdrücken. Einige Blutzuckerbestimmungen zeigten eine weit geringere Hyperglykämie nach Ergotoxin-Adrenalin als nach Adrenalin allein. Der Hemmungsmechanismus besteht infolgedessen darin, daß die Zuckerproduktion herabgesetzt wird. Die Wirkung ist also analog der des Pituitrins. — Da nun die übrigen Wirkungen des Ergotoxins auf Blutdruck und Uterus ebenfalls dem Pituitrin zukommen, habe ich gern dem Vorschlag Prof. Bangs Folge geleistet, die Hemmungswirkung des Ergotoxins gegen Adrenalin näher zu studieren, um möglicherweise eine intimere Übereinstimmung mit der Pituitrinwirkung entdecken zu können.

¹⁾ Diese Zeitschr. 58, 472, 1914.

²⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 69, 133, 1912.

Als Versuchsobjekt dienten wohlernährte Kaninchen. Die Blutzuckerbestimmungen wurden nach Bangs Mikromethode ausgeführt.

Als Vorversuch wurde zuerst ein Versuch darüber angestellt, inwiefern die hier in Betracht kommende Ergotoxinquantität an sich die Blutzuckerkonzentration beeinflusst. Einem Kaninchen wurden deswegen 0,5 mg Ergotoxin subcutan eingespritzt und die Blutzuckerkonzentration vor und die folgenden Stunden nach der Injektion bestimmt. Wie aus der Tabelle I ersichtlich, sinkt die Konzentration während der folgenden 5 Stunden langsam ab. Doch ist die Abnahme recht unbedeutend.

Tabelle I.

Zeit n. d. Injektion	Blutzucker in %
Präf. Blutzucker	0,13
$\frac{1}{2}$ Std. n. d. Injektion	0,11
$1\frac{1}{2}$ " " " "	0,10
$2\frac{1}{2}$ " " " "	0,10
$3\frac{1}{2}$ " " " "	0,09
$4\frac{1}{2}$ " " " "	0,09
$5\frac{1}{2}$ " " " "	0,08.

Die folgende Tabelle II gibt eine Übersicht über die Hemmungswirkung des Ergotoxins gegen Adrenalin. Das Ergotoxin wurde teils vorher, teils gleichzeitig und teils nach der Adrenalininjektion einverleibt.

Tabelle II.

Zeit	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5
	0,2 mg Adrenalin %	0,2 mg Adrenalin + nach 10' 0,3 mg Ergotoxin %	0,2 mg Adrenalin. Gleichzeitig 0,3 mg Ergotoxin %	0,3 mg Ergotoxin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin %	0,3 mg Ergotoxin + nach 1 Std. 0,2 mg Adrenalin %
Präf. Blutzucker	0,09	0,10	0,08	0,11	0,12
$\frac{1}{2}$ Std. n. d. Injekt. v. Adrenalin	0,19	0,21	0,18	0,13	0,15
1 " " " " " "	0,22	0,17	0,22	0,13	0,22
$1\frac{1}{2}$ " " " " " "	0,20	0,17	0,18	0,14	—
2 " " " " " "	0,21	—	—	0,11	0,22
$2\frac{1}{2}$ " " " " " "	—	0,11	0,13	—	—
3 " " " " " "	0,16	—	—	0,10	0,14
$3\frac{1}{2}$ " " " " " "	—	0,10	0,10	—	—
4 " " " " " "	0,10	—	—	0,10	0,12
$4\frac{1}{2}$ " " " " " "	—	0,07	0,10	—	0,11

Aus den Versuchen, die sämtlich an demselben Kaninchen ausgeführt wurden, geht hervor, daß die optimale Hemmungswirkung des Ergotoxins nur dann eintritt, wenn dasselbe eine halbe Stunde vor der Adrenalininjektion eingespritzt wird. Diese Hemmungswirkung geht recht schnell vorüber, denn eine Stunde vor dem Adrenalin injiziertes Ergotoxin beeinflusst

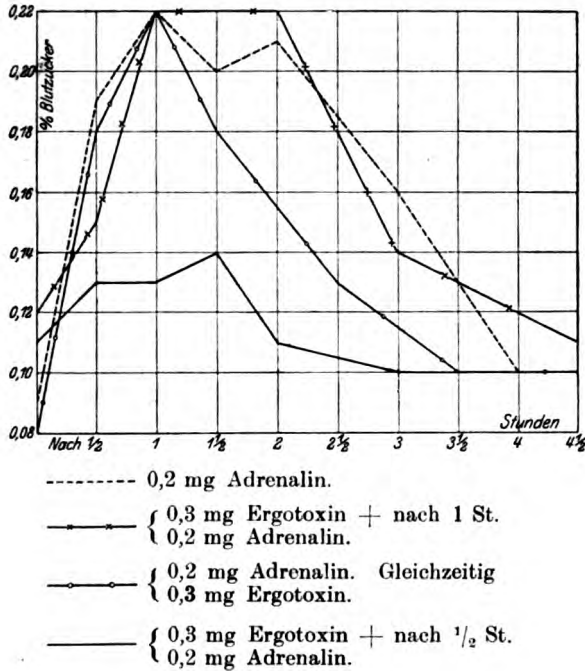


Fig. 1.

Kurventafel I. Graphische Herstellung von Tabelle II.

die Blutzuckersteigerung gar nicht. Auf der anderen Seite hat das Ergotoxin auch keine Wirkung, wenn es gleichzeitig mit dem Adrenalin oder kurz nachher einverleibt wird. In dieser Beziehung stimmt Ergotoxin vollkommen mit Pituitrin überein. Wie Stenström gefunden hat, bleibt die Steigerung des Blutzuckers unverändert, wenn Pituitrin mit dem Adrenalin zusammen oder einige Minuten vor oder nachher eingespritzt wird. Die folgende Tabelle III zeigt die Verhältnisse, wenn Pituitrin längere Zeit vor der Adrenalininjektion gegeben wird.

Tabelle III.

Zeit	Subcutane Injektion von 3 ccm Pituitrin			
	Versuch 1 0,2 mg Adrenalin	Versuch 2 + nach 2 Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 3 + nach 1 Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 4 + nach 1/2 Std. 0,2 mg Adrenalin
Blutzucker in ‰				
Präf. Blutzuckergehalt	0,10	0,11	0,10	0,11
Blutzuckergehalt unmittelbar vor der Adrenalinzufuhr	—	0,11	0,12	0,10
1/2 Std. nach Adrenalinzufuhr	0,21	0,20	0,17	0,10
1 " " " "	0,26	0,22	—	0,11
1 1/2 " " " "	—	—	0,21	—
2 " " " "	0,23	0,21	—	0,09
2 1/2 " " " "	—	—	0,18	—
3 " " " "	0,18	0,14	—	0,12
3 1/2 " " " "	—	—	0,14	—
4 " " " "	0,10	0,10	—	0,12
4 1/2 " " " "	—	—	0,10	—
5 " " " "	0,10	0,10	—	0,09

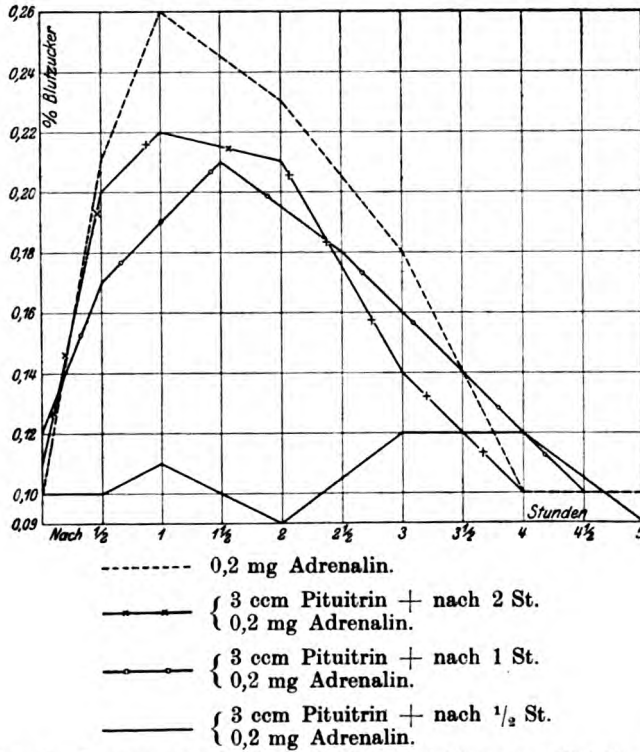


Fig. 2. Kurventafel II. Graphische Herstellung von Tabelle III.

Eine halbe Stunde vor dem Adrenalin gegeben bewirkt das Pituitrin eine komplette Hemmung, während es eine Stunde vorher eingeführt eine wesentlich geringere Wirkung ausübt. Zwei Stunden vorher gegeben ist es so gut wie wirkungslos. Andere Versuche stimmten mit dem angeführten vollständig überein und brauchen nicht referiert zu werden.

Die Versuche zeigen also, daß Ergotoxin und Pituitrin betreffs der Adrenalinhemmung genau übereinstimmen. Man kann folglich vermuten, daß der Mechanismus ihrer Hemmungswirkung derselbe ist.

Diese Möglichkeit läßt sich eingehender experimentell prüfen, und zwar durch folgende Versuchsanordnung: Durch Titrationsversuche wird an einem und demselben Kaninchen die geringste Quantität von Ergotoxin und Pituitrin bestimmt, welche eine bestimmte Adrenalinmenge zu neutralisieren vermag. Es wird weiter festgestellt, welchen Einfluß die halbe Quantität von beiden auf dieselbe Adrenalinmenge ausübt — hier tritt selbstverständlich nur eine partielle Hemmung ein. Schließlich wird die halbe Ergotoxinmenge und die halbe Pituitrinmenge zusammen eingeführt. Wenn dieselbe Adrenalinmenge eine halbe Stunde nachher injiziert wird, soll man eine komplette Hemmung erwarten können, falls die Pituitrin- und Ergotoxinhemmung denselben Angriffspunkt besitzen.

Tabelle IV.

Zeit	Subcutane Injektion von					
	Versuch 1 0,2 mg Adrenalin	Versuch 2 1,5 ccm Pituitrin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 3 0,15 mg Ergoto- xin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 4 0,15 mg Ergotoxin + 1,5 ccm Pituitrin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 5 3 ccm Pituitrin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 6 0,3 mg Ergotoxin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin
	Blutzucker in ‰					
Präf. Blutzucker	0,09	0,10	0,10	0,09	0,12	0,11
$\frac{1}{2}$ Std. nach der Injektion von hemmenden Substanzen	—	0,09	0,12	0,12	0,11	0,11
$\frac{1}{2}$ Std. n. Adrenalinzufuhr	0,19	0,15	0,18	0,11	0,11	0,13
1 " " "	0,22	0,17	0,17	0,12	0,11	0,13
$1\frac{1}{2}$ " " "	0,20	—	—	0,10	—	0,14
2 " " "	0,21	0,14	0,17	0,11	0,11	0,11
3 " " "	0,16	0,12	0,14	0,09	0,12	0,10
4 " " "	0,10	0,13	0,12	0,10	0,10	0,10

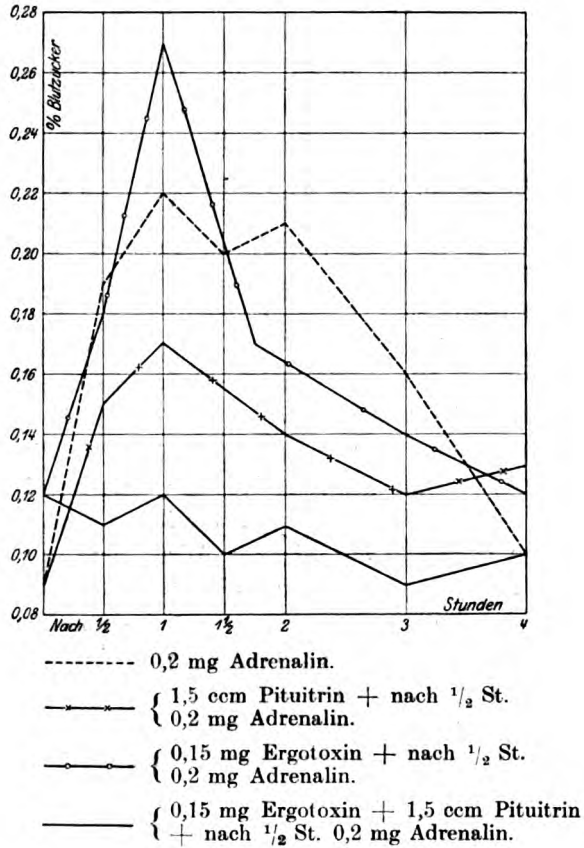


Fig. 3.

Kurventafel III. Graphische Herstellung von Tabelle IV.

Die Tabellen IV, V und VI geben eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse.

Aus den Tabellen und entsprechenden Kurventafeln geht ganz eindeutig hervor, daß eine Summation der Ergotoxin- und Pituitrinwirkung in der Tat stattfindet. Es kann folglich kein Zweifel darüber sein, daß der Angriffspunkt ihrer Hemmungswirkung ein und derselbe ist. Wie Stenström erwiesen hat, kommt keine direkte Einwirkung auf das Adrenalin vor. Dagegen muß man eher annehmen, daß der betreffende Zellbestandteil der Leber, welcher von Adrenalin erregt wird, durch die Ergotoxin-Pituitrineinwirkung in irgendeiner Weise gegen

Tabelle V.

Zeit	Subcutane Injektion von					
	Versuch 1 0,2 mg Adrenalin	Versuch 2 1,5 ccm Pituitrin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 3 0,15 mg Ergotoxin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 4 0,15 mg Ergotoxin + 1,5 ccm Pituitrin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 5 3 ccm Pituitrin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 6 0,3 mg Ergotoxin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin
Blutzucker in ‰						
Präf. Blutzucker	0,11	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10
$\frac{1}{2}$ Std. nach der Injektion von hemmenden Substanzen	—	0,12	0,10	0,09	0,10	0,09
$\frac{1}{2}$ Std. n. Adrenalinzufuhr	0,25	0,16	0,14	0,11	0,10	0,10
I " " "	0,30	—	—	—	—	—
$1\frac{1}{2}$ " " "	0,24	0,21	0,18	0,12	0,11	0,10
$2\frac{1}{2}$ " " "	0,15	0,17	0,18	0,12	0,10	0,10
$3\frac{1}{2}$ " " "	0,09	0,12	0,13	0,12	0,10	0,09
$4\frac{1}{2}$ " " "	0,09	0,11	0,11	0,13	0,10	0,09

Tabelle VI.

Zeit	Subcutane Injektion von					
	Versuch 1 0,2 mg Adrenalin	Versuch 2 1,5 ccm Pituitrin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 3 0,15 mg Ergotoxin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 4 0,15 mg Ergotoxin + 1,5 ccm Pituitrin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 5 3 ccm Pituitrin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin	Versuch 6 0,8 mg Ergotoxin + nach $\frac{1}{2}$ Std. 0,2 mg Adrenalin
Blutzucker in ‰						
Präf. Blutzucker	0,10	0,09	0,10	0,10	0,09	0,10
$\frac{1}{2}$ Std. nach der Injektion von hemmenden Substanzen	—	0,11	0,09	0,09	0,10	0,09
$\frac{1}{2}$ Std. n. Adrenalinzufuhr	0,15	0,14	0,13	0,10	0,11	0,11
$1\frac{1}{2}$ " " "	0,21	0,16	0,16	0,10	0,11	0,10
$2\frac{1}{2}$ " " "	0,13	0,12	0,16	0,11	0,12	0,10
$3\frac{1}{2}$ " " "	0,12	0,12	0,11	0,10	0,10	0,10
$4\frac{1}{2}$ " " "	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

Adrenalin vorübergehend refraktär wird. Da diese Hemmungswirkung so schnell nach der Ergotoxin-Pituitrininjektion zurückgeht, darf man wohl vermuten, daß dieselben von den Leberzellen aufgenommen werden und daß diese Verbindung die

Hemmung bedingt. Es ist sogar recht wahrscheinlich, daß dadurch die Aufnahme des Adrenalins unmöglich gemacht wird, weil sowohl Pituitrin-Ergotoxin wie Adrenalin denselben Angriffspunkt besitzen.

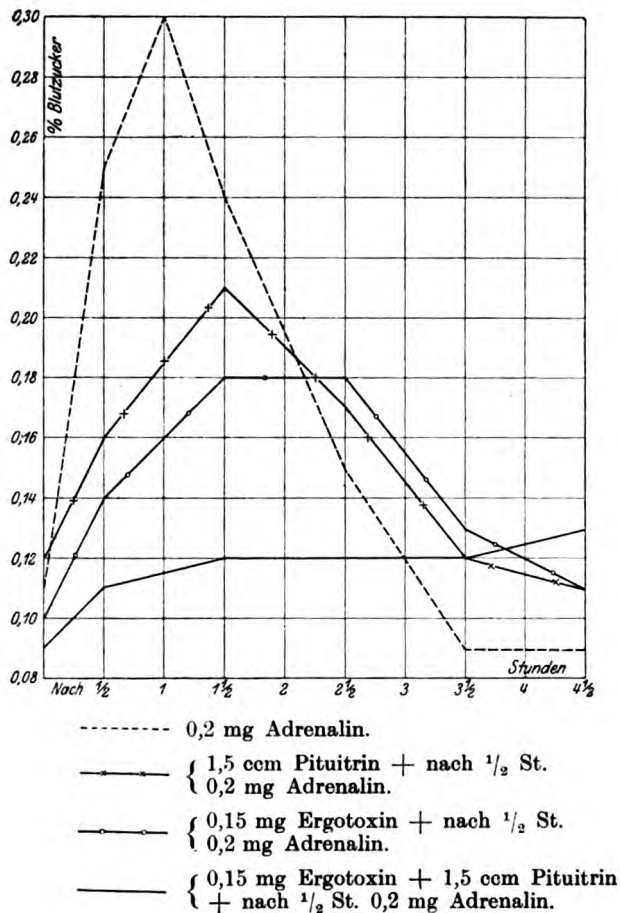


Fig. 4.

Kurventafel IV. Graphische Herstellung von Tabelle V.

Die große Übereinstimmung zwischen Pituitrin und Ergotoxin, welche außer den übrigen schon bekannten Wirkungen besonders durch die oben mitgeteilten Versuche erwiesen ist, spricht entschieden für die Möglichkeit, daß der wirksame Be-

standteil des Pituitrins gegen Adrenalin tatsächlich mit Ergotoxin identisch sei. Wäre dies der Fall, hätte man das inter-

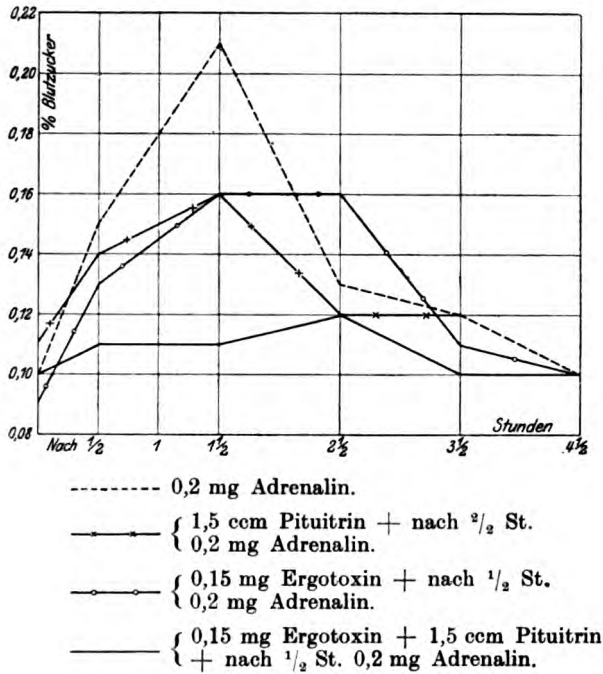


Fig. 5.

Kurventafel V. Graphische Herstellung von Tabelle VI.

essante Ergebnis, daß biologisch wichtige Hormone des Tierkörpers auch von Pilzen gebildet werden können.

Beiträge zur Frage: Wie wird pflanzliches Eiweiß der Nahrung im Tierkörper verwertet?

II. Mitteilung.

Von

H. Boruttau in Berlin.

(Eingegangen am 27. März 1917.)

In der ersten Mitteilung¹⁾ ist berichtet worden, daß die nach dem Vorgang von K. Thomas²⁾ ermittelte sehr niedrige biologische Wertigkeit von isoliertem Weizenmehleiweiß durch geringfügige Zusätze feingepulverten („mechanisch aufgeschlossenen“) geeigneten pflanzlichen Materials (Spinatpulver, Strohpulver) beträchtlich gesteigert wird. Es spricht dies dafür, daß bei der natürlichen Ernährung pflanzenfressender Tiere das pflanzliche Eiweiß nicht „minderwertig“ ist und mit großem Abfall an stickstoffhaltiger Schlacke zum Aufbau des Körpers verwertet wird, sondern daß es durch in der Gesamtpflanzennahrung enthaltene Verbindungen beziehungsweise Atomgruppen vollwertig gemacht, „ergänzt“ wird. Ich habe dort schon auf die Beziehungen dieser ergänzenden Stoffe zu den bei gewissen, auf „teilweise Unterernährung“ zurückgeführten Krankheiten heilend wirksamen hypothetischen „Vitaminen“ hingewiesen — Beziehungen, die in den letzten Jahren vielfach eingehend erörtert worden sind³⁾, — und ich habe auf die auffallende Höhe der Wertigkeitsziffern hingewiesen, die

¹⁾ Diese Zeitschr. 69, 225, 1915.

²⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abt. 1909, 219.

³⁾ Ich will hier nur auf meinen Aufsatz in der Deutschen med. Wochenschr. 1915, Nr. 41, und meinen Vortrag in den Berichten der Deutschen pharmazeut. Gesellschaft, 25. Jahrg., S. 468, sowie auf Röhmans Buch „Über künstliche Ernährung und Vitamine“, Berlin, Bornträger 1916 hinweisen.

seinerzeit K. Thomas für die Stickstoffsubstanzen von Reis gefunden hatte, wobei nicht angegeben war, ob es sich um polierten Reis handelte oder nicht: bekanntlich ist das hypothetische, gegen Beriberi wirksame „Vitamin“ im Silberhäutchen des Reises enthalten, das beim „Polieren“ oder Schleifen entfernt wird.

Ich habe inzwischen Gelegenheit gehabt, am Tier die biologische Wertigkeit der Eiweißsubstanzen von geschliffenem und ungeschliffenem Reis zu ermitteln, wovon ich im folgenden einige Beispiele geben möchte, hinsichtlich deren technischer Einzelheiten ich auf die erste Mitteilung verweisen darf.

Ein Hund von 7,4 kg Körpergewicht wurde vom 22. bis 27. August 1915 stickstofffrei gefüttert, sein Körpergewicht ging auf 7,16 kg zurück. Im Harn schied er im Mittel der letzten beiden Tage 1,22 g N aus, im Kot 0,17 g; er erhielt hierauf 4 Tage lang täglich 200 g ungeschliffenen Reis, 50 g Öl und 10 g Zucker, eine Kost, deren Caloriengehalt der stickstofffreien gleichkam, die aber täglich 2,81 g Stickstoff dem Körper zuführte. In diesen 4 Tagen wurden im Mittel 1,74 g im Harn und 0,88 g N im Kot abgegeben, so daß die Bilanz + 0,19 g N betrug. Das auf 7,1 kg verbliebene Körpergewicht sank in drei weiteren stickstofffreien Tagen mit gleichen N-Ausscheidungsziffern wie oben auf 6,9 kg. Die biologische Wertigkeit der Stickstoffsubstanzen des ungeschliffenen Reises berechnet sich somit nach der ersten Thomasschen Formel zu

$$100 \cdot \frac{1,22 + 0,19}{2,81} = 50,2\%$$

und nach der zweiten zu

$$100 \cdot \frac{1,22 + 0,88 + 0,19}{2,81} = 81,5\%$$

Der Hund erhielt hierauf 4 Tage lang 200 g geschliffenen Reis mit 50 g Öl und 10 g Zucker; an weiteren zwei Tagen wurden von dem Reis nur je 100 g gegeben, so daß eine mittlere Zufuhr von 2,12 g N (nach besonderer Analyse) in diesen sechs Tagen stattfand, während der mit dem Harn durchschnittlich 1,35 und mit dem Kot 0,7 g N abgegeben wurden, so daß die Bilanz + 0,07 g N betrug. In drei weiteren Tagen stickstofffreier Kost sanken die Ausscheidungen wieder auf 1,22

bzw. 0,17 g N, und das in den Reistagen bis auf 7,6 kg gestiegene Körpergewicht fiel wieder bis 6,8 kg. Die biologische Wertigkeit des Eiweißes im geschliffenen Reis berechnet sich also nach der ersten Thomasschen Formel zu

$$100 \cdot \frac{1,22 + 0,07}{2,12} = 61,0\%$$

und nach der zweiten Formel zu

$$100 \cdot \frac{1,22 + 0,7 + 0,07}{2,12} = 93,8\%$$

Also ergibt sich hier für die Stickstoffsubstanz des polierten Reises sogar eine etwas höhere biologische Wertigkeit als für diejenige des unpolierten. Ohne auf hier etwa mitwirkende Umstände näher einzugehen, will ich hier gleich das Ergebnis eines Versuches anschließen, aus Reis unter möglicher Entfernung der Kohlenhydrate hergestellte angereicherte Eiweißpräparate untereinander zu vergleichen. Dank dem Entgegenkommen der Hoffmannschen Reisstärkefabriken in Salzuflen verfügte ich über in gleicher Weise hergestellte Mengen solchen eiweißreichen Materials aus unpoliertem und aus poliertem Reis.

Ein Hund von 10 kg Körpergewicht nach vorangegangener Hungerperiode erhielt vom 17. bis 23. März 1915 stickstofffreie Kost: während sein Körpergewicht nur geringen Schwankungen unterworfen war, stellte sich eine mittlere tägliche Stickstoffausscheidung von 2,83 g im Harn und 0,19 g im Kot heraus. Vom 24. bis 31. März erhielt er eine tägliche Zulage von 35 g des 12,94% N enthaltenden Eiweißpräparates aus ungeschliffenem Reis, also 6,47 g N täglich, und schied im Mittel dieser acht Tage 4,00 g N im Harn und 0,34 g im Kot aus. Es bestand also eine positive N-Bilanz von 2,13 g. In weiteren vier Tagen N-freier Fütterung stellte sich die Harnausscheidung auf 2,45 g, die Kottausscheidung auf 0,29 g N. Nehmen wir als mittlere tägliche Ausscheidung bei N-freier Kost also 2,64 g N an, so berechnet sich die biologische Wertigkeit der Stickstoffsubstanz im Eiweißpräparat aus ungeschliffenem Reis nach der ersten Formel zu

$$100 \cdot \frac{2,64 + 2,13}{6,47} = 73,7\%$$

und nach der zweiten zu

$$100 \cdot \frac{2,64 + 0,35 + 2,13}{6,47} = 79,0\%$$

Dasselbe Tier wurde, nachdem es inzwischen zu einem anderen Versuche gedient hatte, durch die Hungerperiode bis zum 6. Juni auf 10,7 kg Körpergewicht gebracht, das während der folgenden fünf Tage bei N-freier Kost beibehalten wurde, die zu einer N-Ausscheidung im Harn (im Mittel der letzten beiden Tage) von 2,77 g und im Kot von 0,25 g führte. Vier weitere Tage lang wurden je 40 g des Eiweißpräparates aus geschliffenem Reis mit einem N-Gehalt von 7,82% zugelegt, also 3,13 g täglich. Es wurden dabei 2,53 g N im Harn und 0,36 g N im Kot als Tagesmittel ausgeschieden, so daß immer noch eine positive Bilanz von 0,24 g erzielt wurde. Zwei Nachtage mit N-freier Kost ergaben wieder 2,76 g N im Harn. Als biologische Wertigkeit berechnet sich für die N-Substanz des Präparates aus geschliffenem Reis nach der ersten Formel:

$$100 \cdot \frac{2,77 + 0,24}{3,13} = 96,1\%$$

und nach der zweiten:

$$100 \cdot \frac{2,77 + 0,35 + 0,24}{3,13} = 107,3\%$$

Abgesehen von den an sich hohen Werten fällt also auch hier wieder auf, daß das Eiweißpräparat aus geschliffenem Reis höhere Zahlen ergibt, als dasjenige aus ungeschliffenem Reis. Ein Versuch an einem durch längere Fütterung mit ungeschliffenem Reis polyneuritisch gemachten Huhn ergab, daß die bessernde Wirkung eines Extrakts aus dem Eiweißpräparat aus ungeschliffenem Reis deutlich vorhanden, also nicht etwa durch Herstellung des Präparates zerstört war.

Ich erinnere daran, daß eine wesentliche Verbesserung der biologischen Wertigkeit von isoliertem Weizeneiweiß nach den früher mitgeteilten Versuchen nicht nur durch Zusatz geringer Mengen pflanzlicher Präparate erzielt wurde, deren Stickstoffsubstanz, insbesondere nach genügender Aufschließung, selbst hohe biologische Wertigkeitsziffern ergibt, wie das für Spinat und sogar Kleie der Fall ist, sondern auch Friedenthalsches Strohpulver hatte als Zusatz zu „minderwertigem“ Eiweiß diese

Verbesserung bewirkt. Nun habe ich bei Versuchen, wenn möglich, die biologische Wertigkeit der Stickstoffsubstanz des Strohpulvers zu ermitteln, sehr bald erfahren, daß dies unmöglich ist: was von ihr überhaupt resorbiert wird, ist jedenfalls kleiner als die Stickstoffmenge, die von den betreffenden Tieren im „Hungerkot“ abgegeben wird — eine Menge, die bei Zulage von Strohpulver zur leichtresorbierbaren N-freien Kost noch bedeutend erhöht wird, offenbar infolge der Reizwirkung der Strohpartikel auf die Darmschleimhaut. Ich verzichte, hier ausführliche Zahlenbeispiele wiederzugeben, um so mehr, als ja inzwischen von verschiedenen Seiten festgestellt worden ist, daß für den Darmkanal des Hundes und des Menschen die Resorption von Nährstoffen aus dem Strohpulver praktisch gleich Null gesetzt werden muß, Friedenthals Hoffnung, mechanisch aufgeschlossenes Stroh als Nahrungsmittel im Kriege verwenden zu können, sich damit nicht erfüllt hat. Aber wenn auch die aus dem Strohpulver resorbierte Stickstoffmenge sogar kleiner ist, als der N-Verlust des Darmes im Hunger, minimale Mengen müssen resorbiert werden, und gerade diese sind es, die minderwertiges Eiweiß höherwertig machen können! Andererseits ergibt sich aus den hier mitgeteilten Versuchen über die biologische Wertigkeit des Reisklebers, daß gerade Reis, bzw. daraus isoliertes Eiweiß, das die hypothetisch ergänzenden Substanzen, die schon in geringster Menge die Beriberi oder Reispolyneuritis heilen und verhüten können, enthält, nicht die höchstmögliche „biologische Wertigkeit“ zu haben braucht! Wir erkennen hieraus, wie verwickelt die Aufgabe ist, die „fehlenden und zu ergänzenden Stoffe oder Atomgruppen“ einer Eiweißart oder gar eines komplexen Nährstoffgemisches zu ermitteln: schon auf die Dauer der Versuche kommt vieles an, da zur Ermittlung der N-Bilanz und damit der biologischen Wertigkeit eine kürzere Zeit genügt, als zur Hervorrufung eines „Nährschadens“ durch einseitige Ernährung und seiner Heilung durch geeignete Zusätze. Nach den Erfahrungen der letzten Jahre, wie sie von Röhmann und von einer Reihe amerikanischer Forscher gesammelt worden, sind die zur Verhütung „spezifischer Nährschäden“, wie polyneuritischer Symptome einerseits, skorbutischer andererseits geeigneten „Ergänzungstoffe“ unter sich verschieden, und wieder

von ihnen und unter sich verschieden scheinen diejenigen zu sein, die das Wachstum junger Tiere sowie die Erhaltung des Stoffwechselgleichgewichtes erwachsener bedingen. Daß Nährstoffe bzw. Nährstoffgemische (Nahrungsmittel), die den letztgenannten beiden Anforderungen in hohem Maße genügen, hohe Ziffern für die biologische Wertigkeit ihrer Stickstoffsubstanz aufweisen werden, ist naheliegend und wird durch die Ergebnisse der Thomasschen Berechnungen für Fleisch, unveränderte Milch u. a. bestätigt. Ich habe dasselbe gelegentlich bestätigt gefunden für ein Material, auf dessen Bedeutung für die Ernährung des Menschen in neuester Zeit mit Nachdruck hingewiesen wird, nämlich die Getreidekeime, die ja alles enthalten, was zum Aufbau des jungen Pflänzchens notwendig ist, bis die Assimilation in Gang kommen kann. Ein Versuch mit einem Keimpräparat¹⁾ am Hunde führte zu folgendem Ergebnis: Das Tier schied im Mittel von fünf Tagen (5. bis 9. April 1915) N-freier Kost (sehr gleichmäßige Werte) 2,25 g N im Harn und 0,15 g N im Kot aus, und sein Körpergewicht fiel dabei von 9,4 auf 9,2 kg. Weitere drei Tage lang wurden zur selben Kost täglich 100 g des Keimpräparates mit 6,24% N, also 6,24 g N zugelegt. Die mittlere N-Ausscheidung im Harn betrug dabei 3,83 g, im Kot nur 0,14 g, die Bilanz also + 2,27 g N. Es berechnet sich also die biologische Wertigkeit des Getreidekeimeiweißes nach der ersten Formel zu

$$100 \cdot \frac{2,25 + 2,27}{6,24} = 72,4\%$$

und nach der zweiten Formel zu

$$100 \cdot \frac{2,24 + 0,14 + 2,27}{6,24} = 74,7\%$$

Die Werte betragen also etwa das Doppelte der für die isolierten Getreidemehleiweißsubstanzen ermittelten. Weitere derartige Versuche, besonders auch am Menschen, und auch mit Berücksichtigung der Maiskeime, sollen angestellt werden, sobald es die Umstände gestatten. Hingewiesen sei noch darauf, daß der Kotstickstoff in den Tagen mit Keimpräparatzulage nicht mehr betrug als in denjenigen mit stickstofffreier

¹⁾ „Materna“, Dr. Klopfer.

Kost: diese vollkommene Ausnützung des Stickstoffs der Getreidekeime ist von mir in früheren Vorversuchen bereits beobachtet¹⁾, neuerdings auch von v. Noorden²⁾ und Rubner³⁾ in längeren Versuchsreihen gefunden worden.

Ich schließe aus den vorstehend mitgeteilten Ergebnissen, daß man für die Stickstoffsubstanz eines im Sinne der Lehre vom vollständigen Eiweiß „suffizienten“ Nahrungsmittels eine hohe „biologische Wertigkeit“ finden wird, daß man aber aus den Zahlen für diese noch nicht zu Schlüssen über das Vorhandensein oder Fehlen einzelner „Ergänzungstoffe“ oder Atomgruppen berechtigt ist. Natürlich bleibt es die Hauptaufgabe, diese mit ihrer spezifischen Funktion (Verhütung bestimmter Schäden, Erzielung bestimmter Arten von Zellaufbau und Festigung von Stützsubstanz usw.) chemisch zu charakterisieren. Angesichts der Schwierigkeiten, die die Aufgabe bietet, aus einem Abbaugemisch einzelne Bausteine zu entfernen, ohne die andern zu verändern⁴⁾, wird man indessen auch den Versuchen über die Beeinflussung der „Ergänzungstoffe“ durch physikalische und chemische Faktoren, die noch ohne deren chemische Isolierung und Identifizierung unternommen werden, Bedeutung beimessen. Über derart erhaltene Ergebnisse soll weiterhin Mitteilung gemacht werden.

¹⁾ Zeitschr. f. diät. u. physikal. Ther. 1912.

²⁾ Therap. Monatsh. März 1917.

³⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abt. 1917.

⁴⁾ Vgl. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 96, 1, 1915.

Über das Verhalten von Ergänzungsnährstoffen.

I. Mitteilung.

Von

H. Boruttau in Berlin.

(Eingegangen am 27. März 1917.)

Mit 3 Figuren im Text.

Unabhängig von der Deutung, welche die Wirkung der Schutzstoffe gegen Beriberi und Skorbut erfährt, sind die Angaben von praktischem Interesse, die sich in der Literatur über ihr Verhalten gegen Einwirkung höherer Temperaturen mit und ohne Drucksteigerung finden: Nach Shiga und Kusama¹⁾ sollte das wirksame Prinzip der Reiskleie durch Erhitzen auf 130° in $\frac{1}{2}\%$ HCl oder 1% Na₂CO₃, nicht aber schon bei 100° zerstört werden. Nach Grijns²⁾ verlieren die polyneuritischeilenden Stoffe in Reiskleie, Bohnen und Fleisch ihre Wirksamkeit durch Erhitzen auf 120°. Dagegen gab Funk³⁾ an, daß sein „Vitamin“ nach 20stündigem Erhitzen mit Schwefelsäure seine Heilwirkung teilweise beibehielt. Nach Axel Holst und Fröhlich⁴⁾ kommt es bei den Stoffen, deren Gegenwart den experimentellen Skorbut verhütet, neben der Temperatur wesentlich auf den Wassergehalt und die Reaktion an: im allgemeinen schädigt trockenes Erhitzen auf 110° bis 120° sie mehr als Kochen bei 100°; durch Säurezusatz läßt sich ihre Thermostabilität erhöhen. Gering ist offenbar die Thermostabilität gewisser Bestandteile der Milch, die für die Ernährung der heranwachsenden Individuen wichtig sind, wie

¹⁾ Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Beihefte 3/5, 1911.

²⁾ Geneeskund. Tijdschr. f. nederl. Indie 41, 1901, 49, 1909.

³⁾ Journ. of Physiol. 43, 395, 1911.

⁴⁾ Journ. of Hygiene 7, 634.

durch die bekannten Arbeiten von Neumann, Cassel, Finkelstein u. a. für Kinderernährung, von Gerlach, Price und Doane, Esser u. a. für die Aufzucht von Kälbern usw. nachgewiesen ist. Es wird hier besonders von amerikanischen Forschern neuerdings ausdrücklich unterschieden zwischen „antiskorbutischen Stoffen“, deren Fehlen schwere Störungen des Knochenwachstums, Erkrankungen der Schleimhäute usw. hervorruft, Stoffen, die, ganz allgemein ausgedrückt, „das Wachstum befördern“, — deren Fehlen im künstlichen Ernährungsversuche die Gewichtszunahme wachsender Tiere hintanhält,

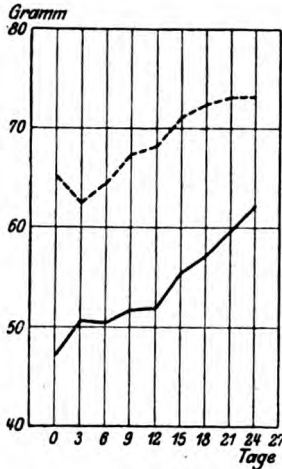


Fig. 1a.

— 4 Mäuse, Weißbrot mit Kartoffelschnitzelzulage.
 - - - - 5 Kontrolltiere, nur Weißbrot.

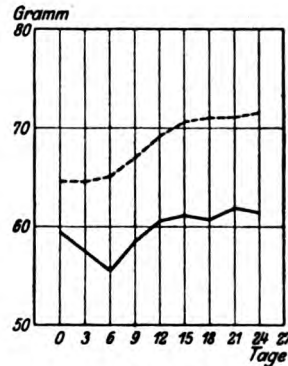


Fig. 1b.

— 5 Mäuse, Weißbrot mit erhitzten Kartoffelschnitzeln.
 - - - - 5 Kontrolltiere, nur Weißbrot.

und endlich Stoffen, die überhaupt zur Erhaltung des Stoffwechselgleichgewichts, auch beim erwachsenen Tier, nötig sind. Mag man über diese Unterscheidungen im übrigen urteilen, wie man will, so wird man jedenfalls zugeben müssen, daß die Untersuchung der Beeinflussung des Verhaltens von Nahrungs- und Futtermitteln in diesen drei Richtungen durch Temperatursteigerung und Wasserentziehung von großer praktischer Bedeutung ist. Dies gilt besonders angesichts der Wichtigkeit, die der künstlichen Trocknung von Nahrungsmitteln und Futtermitteln zukommt, und die im gegenwärtigen Krieg sich uns so

aufgedrängt hat, daß die Trocknungsindustrie einem ungeahnten Aufschwung entgegenzugehen scheint. Hier brachten es nun die bisherigen technischen Verhältnisse mit sich, daß vorwiegend hohe Temperaturen, wie sie überhitzter Dampf und Feuergase von Kesselanlagen usw. haben, zur Trocknung verwendet wurden. Daß hierbei durch Koagulierung der Eiweißkörper zu festen, in den Verdauungssäften kaum löslichen Massen die Ausnützung des Stickstoffs und die Lösungsmöglichkeit unlöslicher Kohlenhydrate (Aufschließung der Zellulose, Spaltung der Pentosane) sehr erschwert wird, ist den landwirtschaftlichen Chemikern bekannt¹⁾; daß Sterilisation von Getreide bei 120° dasselbe zur Ernährung ebenso insuffizient macht wie Schälung, ist neuerdings von Weil und Mouriquaud²⁾ angegeben. Im allgemeinen aber scheint von seiten der Trocknungsindustrie die durch die Verwendung der hohen Temperaturen gegebene Gefahr nicht erkannt oder unterschätzt zu werden, wozu noch die technischen Schwierigkeiten kommen, ohne Energieverlust mit niederen Temperaturen zu arbeiten oder Abgase niedriger Temperatur praktisch zu verwerten. Einen vielversprechenden Anfang bildet ein Verfahren, das in einer von Klopfer und Schulze angeregten, von C. Wagner durchgebildeten Versuchsanlage auf dem Gelände der Dresdener Technischen Hochschule arbeitet und Temperaturen über 60° vermeidet und gestattet, die Abwärme von Elektrizitätswerken und anderen Anlagen auszunützen, die bis jetzt verloren ging. Ich habe einige Fütterungsversuche angestellt, in denen ich in dieser Anlage hergestellte Kartoffeltrockenschnitzel als Zulage zu einem anerkannt insuffizienten Futter,

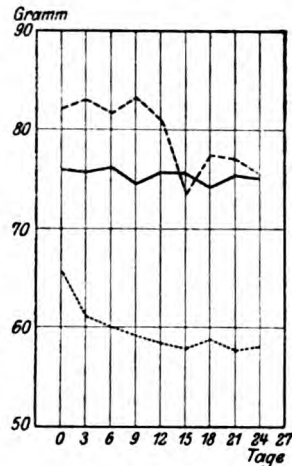


Fig. 2.

— 4 Mäuse, Weißbrot mit Kartoffelschnitzelzulage.
 - - - 4 Mäuse, Weißbrot mit erhitzt. Kartoffelschnitzeln.
 4 Kontrolltiere, nur Weißbrot.

¹⁾ Siehe auch Pickardt, Deutsche med. Wochenschr. 1900, 823.

²⁾ Compt. rend. Soc. Biol. 78, 649, 1915; 79, 194, 1916.

nämlich milchfreiem Weizengerstenbrot, bei Mäusen verwendet habe. Es wurde sowohl die Beeinflussung des Wachstums als auch die Erhaltung konstanten Körpergewichts berücksichtigt; die in Fig. 1 und 2 wiedergegebenen Gewichtskurven der Zulage-tiere und der Kontrolltiere ohne Zulage lassen den Einfluß deutlich erkennen, wogegen Zulage derselben Schnitzel, die aber vorher mehrere Stunden bei 120° getrocknet waren, den Einfluß nicht ausübt. Grundsätzlich das gleiche Ergebnis habe ich bei Zulagen zu einer insuffizienten (trockenen) Kost bei Meerschweinchen erzielt; auch hier verhinderte die Erhitzung des zugelegten Materials die sonst erfolgte Einhaltung des konstanten Körpergewichts. Ich werde über diese Versuche dem-nächst berichten im Zusammenhang mit andern, noch im Gang befindlichen, die das verschiedene Verhalten der lipoidlöslichen und der wasserlöslichen „Ergänzungsstoffe“ betreffen.

Extraktionsversuche mit verschiedenen Trockenhefen.

Von

Eduard Buchner und Siegfried Skraup.

(Aus dem Chemischen Institut der Universität Würzburg.)

(Eingegangen am 29. März 1917.)

Die Bedingungen, unter welchen die Zymase¹⁾ durch engporige Filter und semipermeable Membranen durchzudringen vermag oder davon zurückgehalten wird, sind auffallend mannigfaltig. So ist es bisher nicht gelungen, den Austritt der Gärungsenzyme aus frischen lebenden Hefezellen nachzuweisen²⁾. Sobald man jedoch Plasmolyse der Hefe hervorruft, wird Zellsaft ausgepreßt, der nun auf Zuckerzusatz mehr oder weniger Gärwirkung entfaltet. Diese Plasmolyse kann durch Zusatz von Salzen oder von lipidlöslichen Stoffen, wie Äther oder Chloroform, herbeigeführt³⁾ oder auch durch Ausfrieren der Hefe bei der Temperatur der flüssigen Luft eingeleitet werden⁴⁾.

Im merkwürdigen Gegensatz dazu steht wieder das Verhalten der Zymase gegenüber künstlich hergestellten semipermeablen Scheidewänden. Bald nach der Entdeckung der zellfreien Gärung wurde ermittelt, daß die Gärungsenzyme nicht

¹⁾ Unter diesem Namen seien hier die verschiedenen Gärungsenzyme der Hefe zusammengefaßt.

²⁾ Nähere Angaben s. z. B. E. und H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, München 1903, 13, 123. Ähnliches gilt bekanntlich auch für die Invertase; sie läßt sich aus frischen Hefezellen nur in sehr unbedeutendem Grade ausziehen. S. z. B. von Euler und Kullberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 29; 73, 93, 1911.

³⁾ Literatur darüber s. Die Zymasegärung 1903, 69; neuere Versuche: P. Rinokleben, Chem.-Zeitg. 1911, 1149; 1912, 365.

⁴⁾ S. den letzten Abschnitt dieser Mitteilung.

durch Pergamentpapier hindurchtreten¹⁾; die anfangs sehr unvollkommene Versuchsanordnung wurde dann später durch Benutzung des Gürberschen Rührers²⁾ und durch Zusatz des unentbehrlichen, aber leicht diffundierenden Koenzyms zu dem Rückstand bei der Gärprobe³⁾ verbessert, so daß die Unpassierbarkeit von Pergamentpapier für die Zymase als einwandfrei erwiesen gelten kann. Inzwischen hatten auch Harden und Young⁴⁾ gezeigt, daß ein Gelatinefilter nach Martin die Zymase zurückhält. Dagegen wurde festgestellt, daß man Hefepreßsaft durch Berkefeld-Kieselgurfilter⁵⁾ und sogar durch Chamberland-Biskuitporzellankerzen⁶⁾ hindurchsaugen kann, ohne die Gärkraft völlig zu vernichten; im letzteren Falle trat allerdings bald eine Verstopfung des Filters ein, wahrscheinlich infolge zu starker Adsorption auf dem Filtermaterial⁷⁾.

Besondere Aufmerksamkeit verdienen nun Versuche über den Austritt der Gärungsenzyme aus zwei Arten von Trockenhefen.

Schlechte Extrahierbarkeit der Aceton-Dauerhefe.

Wäßrige Auszüge aus Aceton-Dauerhefe (auch Zymin genannt), die bekanntlich durch Eintragen der frischen Hefe in Aceton und Nachwaschen mit Äther dargestellt wird⁸⁾, zeigen auf Zuckerzusatz keine oder nur ganz geringfügige Gärwirkung. Diese frühzeitig gemachte Erfahrung⁹⁾ hat sich jetzt von neuem bestä-

¹⁾ E. Buchner und R. Rapp, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **31**, 214, 1898; Die Zymasegärung **1903**, 120. Die Bemerkung von M. W. Beijerinck und J. J. van Hest (Folia Microbiologica **4**, Heft 2, Seite 3, Febr. 1916), es sei nicht erwogen worden, „ob das sehr bestimmt als Enzym angedeutete Gärungagens löslich oder unlöslich sei“, trifft somit nicht zu.

²⁾ Buchner und W. Antoni, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 210, 1905.

³⁾ Buchner und W. Antoni, Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 153, 1905.

⁴⁾ Proc. Roy. Soc. **77**, 405; **78**, 369, 1906.

⁵⁾ Buchner und Rapp, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **31**, 216, 1898.

⁶⁾ Die Zymasegärung **1903**, 115.

⁷⁾ Vgl. Bechhold, Die Kolloide in Biologie und Medizin **1912**, 173.

⁸⁾ Albert, Buchner und Rapp, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, 2376, 1902.

⁹⁾ R. Albert, Ber. **33**, 3777, 1901; Buchner und Meisenheimer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **40**, 167, 1903; Die Zymasegärung **1903**, 259. Deshalb unterblieben meinerseits alle weiteren Extraktionsversuche mit unzerriebenen Trockenhefen.

Buchner.

tigt. In 9 unter 11 untersuchten Fällen blieb die Gärwirkung für 20 ccm Extrakt unterhalb 0,2 g Kohlendioxyd (s. Tabelle III), obwohl auch in den negativ verlaufenen Fällen die Dauerhefe selbst von guter Wirksamkeit war. Dies ergab sich aus der üblichen Gärprobe und daneben auch beim Zerreiben der Präparate vor der Extraktion; nach Zertrümmerung der Zellen wurden nämlich Auszüge erhalten, die starke Gärwirkung aufwiesen. Natürlich muß das Pulverisieren in einer Weise vorgenommen werden, daß dadurch keine Schädigung der Gärwirkung eintritt, also ohne lokale Überhitzung, am besten in einer Kugelmühle, und nicht zu weitgehend, sonst machen sich Adsorptionerscheinungen in hohem Grade geltend. Bei den negativen Versuchen kann es sich nicht um einen Mangel an Ko-Enzym oder an Invertase handeln, denn diese treten nachweislich in genügender Menge rasch aus der Aceton-Dauerhefe heraus¹⁾. In den unzerriebenen Zellen dieser Trockenhefe muß also entweder in der Zellmembran (auch Cellulosehaut genannt) oder in der peripheren Plasmahaut, der äußeren Grenzschichte des Protoplasten oder Protoplasmaschlauches, welche normal der Zellmembran anliegt und im vorliegenden Fall durch die Acetonbehandlung verändert ist, ein Hindernis für den Austritt der eigentlichen Zymase bestehen.

Leichte Extrahierbarkeit der Lebedew-Hefe.

Aus normaler Bierunterhefe erhaltene Lebedew-Hefe, einfach durch Trocknen der Hefe an der Luft gewonnen²⁾, verhält sich bei der Herstellung von wäßrigen Auszügen völlig umgekehrt als die eben besprochene Aceton-Dauerhefe: Sie gibt nämlich direkt, ohne Öffnen der Zellen, die Gärungsenzyme

¹⁾ Über das Verhalten des Koenzyms liegen außer einer Reihe noch nicht veröffentlichter eigener Versuche Angaben von Harden und Young, Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 26, 183, 1910 vor. Auch Invertase ist ziemlich leicht extrahierbar, s. Buchner und Antoni, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 209, 1905; H. von Euler und Beth af Ugglas, ebenda 70, 281, 1911.

²⁾ A. von Lebedew, Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 447, 1911. — Die Ausarbeitung der Methode begann A. von Lebedew bereits im chemischen Laboratorium der landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin, das damals unter meiner Leitung stand (vgl. diese Zeitschr. 20, 116, Anm. 3, 1909).
Buchner.

leicht an Wasser ab [Tabelle IV¹]. Durch vorhergehendes Zerreiben kann eine Verbesserung der Auszüge nicht herbeigeführt werden. Da die mikroskopische Untersuchung der aus Münchner und aus Würzburger Unterhefe hergestellten Lebedew-Hefen ergab, daß die Zellen beim Trocknen völlig unverletzt bleiben, müssen hier also die Gärungsenzyme durch die Zellmembran und die Plasmahaut leicht hindurchzutreten vermögen.

Im Anschluß daran wurde auch die Diffusion von gerinnbarem Eiweiß und von Endotryptase aus den beiden Arten von Trockenhefen ausführlich untersucht (Tabelle V); auch hier zeigte sich der typische Unterschied zwischen Aceton-Dauerhefe und Lebedew-Hefe. In unzerriebenen Zustände gibt erstere Auszüge, welche beim Aufkochen lediglich Spuren von Gerinnsel ausscheiden und erstarrte Gelatine nur wenig verflüssigen; wohl aber enthalten nach dem Zerreiben die Extrakte viel koagulierbares Eiweiß und erhebliche Mengen von Endotryptase. Die Lebedew-Hefe liefert dagegen schon ohne Zertrümmerung der Zellen in beiden Richtungen positive Resultate, welche sich durch Zerreiben vor der Extraktion nicht verbessern lassen.

Diese Versuche zeigen, daß die Zellmembran, welche bei den verschiedenen Herstellungsarten der Trockenhefen kaum verändert werden dürfte, kein Hindernis für die Extraktion der gerinnbaren Eiweißkörper, der Endotryptase und der Zymase bildet. Dagegen muß der Unterschied zwischen den beiden Arten von Trockenhefen in einer Veränderung der Plasmahaut durch die Behandlung begründet sein.

Bei der Darstellung der Lebedew-Hefe wird die Plasmahaut, welche den Austritt vieler Stoffe auch aus den lebenden Zellen verhindert, in ihren osmotischen Eigenschaften demnach wesentlich geändert²). Vermutlich handelt es sich dabei um

¹) Auf diesen auffallenden Unterschied hat auch schon L. Iwanoff [Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 24, 10 (1909)] kurz hingewiesen; er schreibt, daß beim Auswaschen von Zymin die Alkoholase (= Zymase) im unlöslichen Rückstand bleibt, während bei gleicher Behandlung von Hefanol, einem der Lebedew-Hefe ähnlichen Trockenpräparat, ein bedeutender Teil der Alkoholase in den Extrakt übergeht.

²) Das verschiedene Verhalten von lebenden und getrockneten Hefezellen bei Extraktionsversuchen hat zuerst Emil Fischer (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 28, 1438, 1895) beobachtet.

Schrumpfungen und Zerreißen beim fortschreitenden Austrocknen, wodurch Lücken von submikroskopischen Dimensionen entstehen, welche den Durchtritt gestatten. Daß solche Veränderungen sehr wohl auftreten können, dafür kann als Beweis dienen, daß unzerriebene Lebedew-Hefe, hergestellt aus einer Rotterdamer untergärigen Bierhefe¹⁾, bei der mikroskopischen Untersuchung schon $\frac{2}{3}$ verletzte und größtenteils aufgerissene Zellen aufwies; hier war also die offenbar sehr zarte Zellmembran dieser Heferasse schon beim Austrocknen vielfach geplatzt²⁾ (s. Tabelle II). Die Zerreißen der Plasmahaut beim Austrocknen der Lebedew-Hefe können durch den steigenden Salzgehalt unterstützt werden³⁾, der unter Überschreitung des Schwellenpunktes vielleicht einen Teil der Eiweißkörper zur reversiblen Koagulation bringt, so daß dadurch Lücken auftreten. Die Gärungsvorgänge mit unzerriebener Lebedew-Hefe werden somit zum Teil innerhalb, zum Teil außerhalb der Zellen stattfinden.

Bei der Darstellung der Aceton-Dauerhefe dagegen tritt keine langsame Wasserabgabe ein, sondern die Eiweißkörper der Plasmahaut werden durch den Acetonzusatz augenblicklich gefällt⁴⁾, und zwar zum Teil irreversibel⁵⁾. Als Beweis kann angeführt werden, daß die Alkohol-Äther-Fällung des Hefepreß-

¹⁾ Für die Zusendung dieser Probe sind wir Herrn Prof. Dr. M. W. Beijerinck, Delft, zu lebhaftem Dank verpflichtet.

²⁾ Beijerinck und J. J. van Hest, deren Beobachtungen mit den unseren völlig übereinstimmen, nehmen an, daß beim Macerieren dieser Hefe mit Wasser infolge der Wirkung einer Cytase die Zellmembran geschädigt und durch Auflösung dünner wird (*Folia Microbiologica* 4, Heft 2, S. 8 [Febr. 1916]; *Chem. Centralbl.* 1916, I, 765).

³⁾ Vgl. E. Lenk, Bedeutung der Elektrolyte für Quellungsprozesse, diese Zeitschr. 73, 15—106, 1916; ferner The Svedberg, Kolloide, *Ber. d. Deutsch. chem. Ges.* 47, 12, 1914.

⁴⁾ Aceton setzt schon in verdünnter Lösung den Quellungsgrad von Kolloiden herab; vgl. M. H. Fischer und A. Sykes, *Kolloidzeitschr.* 14, 215, 1914.

⁵⁾ Für die Plasmahaut weisen alle Erfahrungen auf eine Eiweißnatur hin; die Bausteine der Plasmahaut müssen sehr dicht gelagert sein; Aceton führt zur irreversiblen Koagulation. Vgl. W. Ruhland, Artikel: Turgor in Teichmanns Handwörterbuch der Naturwissenschaften 1913, 102.

saftes in Wasser nicht mehr vollständig löslich ist¹⁾; dasselbe gilt für die Aceton-Fällung. Da aber die wäßrige Lösung dieser Niederschläge, mit Zucker versetzt, gute Gärwirkung zeigt, kann die Zymase selbst nur reversibel gefällt sein. Die Gerinnsel von Eiweißkörpern verstopfen nun offenbar die Poren der Zellmembran und verhindern dadurch den Austritt der obengenannten drei Stoffe aus der Aceton-Dauerhefe, ähnlich wie die Zymase auch nicht durch gewöhnliches Pergamentpapier hindurchgeht. Der Gärungsvorgang findet bei der unzerriebenen Aceton-Dauerhefe daher im Zellinnern statt, ebenso wie bei der lebenden Hefezelle. Dabei muß der Zucker durch die Zellmembran und die Plasmahaut hindurch in die Zellen hineindiffundieren, was offenbar sehr schnell, ohne wahrnehmbare Verzögerung, erfolgt. Einen Beweis dafür bildet, daß die unzerriebene Aceton-Dauerhefe beim Übergießen mit Zuckerlösung etwas rascher angärt als die zerriebene²⁾, die allerdings in den untersuchten Fällen durch halbstündiges kräftiges Pulverisieren in der Reibschale infolge lokaler Überhitzung wohl etwas geschädigt war.

Ein nicht unerheblicher Unterschied zwischen Lebedew-Hefe und Aceton-Dauerhefe tritt auch hervor, wenn man mehrere Tage mit Wasser und etwas Toluol bei 37° aufbewahrte Proben, aus gleicher Hefe hergestellt, der Färbung nach Gram unterzieht. Bei ersterer erfolgt dann viel früher Rotfärbung der Zellen, wogegen die letztere noch länger stark blaue Zellen aufweist. D. h. also, die Eiweißkörper der Lebedew-Hefe werden rascher von den Verdauungsenzymen der Zellen angegriffen und sind nicht so stark entquollen wie die Eiweißkörper der Aceton-Dauerhefe³⁾.

Daß die einzelnen Heferassen in den osmotischen Eigenschaften weitgehende Unterschiede aufweisen, zeigt auch das Verhalten der Oberhefen, bei welchen, selbst wenn sie in fri-

¹⁾ R. Albert und R. Buchner, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 971, 1900; Buchner und R. Hoffmann, diese Zeitschr. **4**, 222, 1907; Die Zymasegärung **1903**, 238.

²⁾ Buchner und Antoni, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 216, 219, 1905.

³⁾ Vgl. hierzu R. und W. Albert, Centralbl. f. Bakt., II. Abt. **7**, 737, 1901; R. Trommsdorff, ebenda **8**, 82, 1902.

schem Zustande gute Gärwirkung besaßen, im allgemeinen sowohl die Darstellung von wirksamem Preßsaft wie von gärfähiger Dauerhefe mehr oder weniger mißlingt¹⁾. M. W. Beijerinck²⁾ folgert aus negativen Versuchen mit einer „Brothefe“ einer Delfter Preßhefefabrik, daß hier die Zellen wegen ihrer dickeren Wand viel schwieriger zu öffnen seien, was durch den mikroskopischen Befund bestätigt werde. Die völlige Aufklärung des abweichenden Verhaltens der Oberhefe muß erst die Zukunft bringen.

Folgerungen für die Natur der Zymase.

Beobachtungen über die auffälligen osmotischen Eigenschaften der Gärungsenzyme haben in letzter Zeit einige Forscher zu Annahmen über die Natur der Zymase geführt, welche nicht unwidersprochen bleiben können³⁾.

So äußern M. W. Beijerinck und J. J. van Hest⁴⁾: „Die schon früher ausgesprochene Meinung, daß die Endoenzyme der Hefezellen nichts weiteres wie das lebende Protoplasma selbst sind, fängt erst gegenwärtig an, zur allgemeinen Anerkennung zu kommen.“ In dieser Ansicht sind die Forscher wesentlich dadurch bestärkt worden, daß ihnen zufällig die oben erwähnte Rotterdamer Unterhefe zur Herstellung von Lebedew-Hefe diente, die sehr wirksamen wäßrigen Auszug lieferte, sich aber ganz gegen die Regel reich an aufgerissenen Zellen erwies. Sie glauben deshalb annehmen zu dürfen, „daß die Aktivität des Saftes der im Rückstand aufgefundenen Anzahl von geöffneten Zellen proportional ist“⁵⁾. Dieser Leitsatz wird aber dadurch widerlegt, daß Lebedew-Hefen, hergestellt

¹⁾ Die Zymasegärung 1903, 57; v. Euler und Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 193, 1913, Anm. 1; Harden und Young, diese Zeitschr. 40, 474, 1903. Dagegen hat van Laer aus Lebedew-Hefe, hergestellt mittels Oberhefe von Mons, sehr gärkräftige Auszüge erhalten; Centralbl. f. Bakt. II 37, 531, 1913.

²⁾ Folia Microbiologica 4, Heft 2, S. 6, 8 (Febr. 1916).

³⁾ Über die Rolle der Struktur für die Gärwirkung der Zymase liegen besondere Annahmen von O. Warburg (vgl. Wirkung der Struktur auf chemische Vorgänge in Zellen, Jena, G. Fischer, 1913, 14) vor, die aber erst in einer späteren Mitteilung besprochen werden sollen.

⁴⁾ Folia Microbiologica 4, Heft 2, S. 1 (Febr. 1916).

⁵⁾ A. a. O. S. 7.

aus deutschen untergärigen Bierhefen, gewöhnlich keine geöffneten Zellen enthalten und doch Auszüge von kräftiger Gärwirkung ergeben. In Berücksichtigung der sonstigen Eigenschaften des Hefepreßsaftes, seiner Fällungen und der sterilen Trockenhefen dürfte die obige, längst widerlegte Annahme gegenwärtig jedenfalls nicht mehr viele Anhänger finden.

W. Ruhland geht von der Beobachtung aus, daß viele Enzyme, z. B. gewisse Invertasen, Diastasen, Oxydasen, leicht durch Gele und die Plasmahaut hindurchtreten¹⁾. Da demnach sowohl die Membran als die Plasmahaut für die Extrahierbarkeit der Enzyme anscheinend gar keine Bedeutung haben, gelangt Ruhland, um doch das Festhalten der Gärungsagencien in der Zelle und die Lokalisation daselbst erklären zu können, zur Vorstellung einer intra vitam bestehenden „festen, wohl chemischen Verkettung dieser Enzyme mit den Plasmateilchen“, welche die Wirksamkeit nicht behindern und mit dem Tode zerfallen soll²⁾. Diese beachtenswerte Hypothese wird aber widerlegt durch das Verhalten der Aceton-Dauerhefe, welche trotz nachgewiesener Abtötung der Hefezellen doch die Zymase an Wasser nicht abgibt³⁾; es muß also hier eine andere Ursache als die hypothetische Bindung an das lebende Plasma den Austritt des Gärungsagens verhindern, welche oben schon besprochen wurde. Der von Ruhland auf Grund seiner Versuche gezogene Schluß, daß alle freien Enzyme semipermeable Membranen zu durchdringen vermögen, ist eben nicht stichhaltig; die einen sind zur Dialyse imstande, die anderen nicht⁴⁾. Zu letzteren scheinen außer der Hefenzymase

¹⁾ „Wir müssen in den Enzymen . . . solche Kolloide erblicken, die auf das leichteste durch die Plasmahaut zu permeieren vermögen.“ Biol. Centralbl. **33**, 346, 1913.

²⁾ Ebenda **33**, 337, 1913.

³⁾ Auch die beiden nach unseren obigen Versuchen (Tab. IV Nr. 10 u. 11) bei der Extraktion in unzerriebenen Zustande die Zymase nicht abgebenden Lebedew-Hefen können als Beweis gegen Ruhlands Annahme dienen. Ein besonderer Versuch hat uns gezeigt, daß die Lebedew-Hefen im allgemeinen nur tote Zellen enthalten.

⁴⁾ Beijerinck und van Hest (a. a. O. S. 9) zeigen z. B., daß die Zymase nicht in Agar und Gelatine eindringt, was dagegen für Diastase, Peptase und Tryptase leicht nachweisbar ist. Auch v. Euler und Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, 176, 1912, unterscheiden bezüglich der Extraktionsfähigkeit zwei Gruppen von Enzymen in der Hefe (darüber s. unten).

auch die Milchsäurebakterienzymase¹⁾ und die Alkoholoxydase der Essigbakterien²⁾ zu gehören, welche sich bisher als nicht einmal abtrennbar von den Zelltrümmern erwiesen haben; ob diese vorläufige Feststellung dauernd gültig bleiben wird, muß sich erst zeigen; denkbar wäre auch, daß es sich hier um noch größere Teilchen handelt, die nahezu vollständig an den Zell- und Kieselgurstückchen adsorbiert werden. Ruhland nimmt in diesen Fällen eine festere, auch noch postmortale Verkettung der Enzyme mit dem Plasma an.

Übereinstimmend mit Ruhlands Anschauungen sind auch wir zu der Erkenntnis gelangt, daß es nicht die Zellmembran ist, die den Austritt mancher Enzyme verhindert, sondern die Plasmahaut³⁾. Endlich sei noch bemerkt, daß Ruhland unter der Voraussetzung der Annahme einer intra vitam bestehenden Plasmaenzymverbindung, den Vorschlag M. Rubners, die Gärungsvorgänge in zwei Gruppen, nämlich in fermentative und vitale einzuteilen, die wir aus anderen Gründen ablehnen⁴⁾, für ganz unnötig erklärt⁵⁾.

Auch H. von Euler hatte schon vor Ruhland eine interessante „Arbeitshypothese“ aufgestellt, die den Ansichten des letzteren Forschers in mancher Richtung ähnelt: „Die Zymase ist in der lebenden Zelle als chemischer Komplex ganz oder teilweise an das Protoplasma gebunden; wird die vitale Tätigkeit der Zelle dauernd oder zeitweise aufgehoben, so wird auch die gärungserregende Gruppe des Protoplasmas, also die an das Plasma gebundene Zymase, inaktiviert; wirksam bleibt nur derjenige Teil des Gärungsenzyms, der (frei ist oder) bei der Entwässerung der Hefe im Vakuum oder durch Alkohol freigemacht wird“⁶⁾. Hauptsächlich sind es vier Erwägungen, die zu diesen Annahmen geführt haben:

¹⁾ Buchner und Jakob Meisenheimer, Ann. d. Chem. **349**, 131, 1906.

²⁾ Buchner und R. Gaunt, ebenda **349**, 150, 1906.

³⁾ Ruhland, diese Zeitschr. **54**, 70, 1913; Jahrb. f. wiss. Botanik **54**, 420, 1914.

⁴⁾ Buchner und Skraup, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **47**, 853, 1914.

⁵⁾ Ruhland, Jahrb. f. wiss. Botanik **54**, 437, 1914.

⁶⁾ Von Euler und Beth af Ugglas, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 286, 1911; s. bes. auch: Von Euler und Paul Lindner, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung, Leipzig 1915, 251, 313. Übrigens

1. Der Abfall der Gärwirkung beim Trocknen und Töten der Hefe. Bei sehr vorsichtigem Trocknen der Hefe z. B. innerhalb 5 Minuten im Vakuum bei 40° , worauf meistens noch eine halbstündige Erhitzung auf 90° erfolgte, ließ sich nur $\frac{1}{14}$ bis $\frac{1}{30}$ der Zymase wirksam erhalten¹⁾. Zum Vergleiche wurden Gärversuche in 10%iger Zuckerlösung mit der lebenden Hefe und der Trockenhefe nebeneinander durchgeführt und die innerhalb 2 bis 3 Stunden entwickelte Menge Kohlendioxyd bestimmt; man wählte eine so kurze Beobachtungszeit, um eine Neubildung von Zymase in den lebenden Zellen zu vermeiden. Die Versuche sind aber dadurch schwer beeinträchtigt worden. Das Trocknen der Hefe muß infolge der erhöhten Temperatur und des steigenden Salzgehaltes die Enzyme zur reversiblen Koagulation bringen; es bedarf bei der Befeuchtung mit Wasser dann natürlich einer längeren Zeit, bis sie den für die Wirkung nötigen Quellungszustand wieder angenommen haben²⁾; kurz nach dieser Zeitperiode schon wurden die Ablesungen gemacht. Bei längerer Versuchsdauer wäre die Schädigung durch das Trocknen sicher wieder mehr zurückgetreten; allerdings hätte sich dann eine verstärkte Neubildung von Zymase in der lebenden Hefe geltend gemacht. Nach unseren früheren Versuchen läßt sich $\frac{1}{7}$ der Gärwirkung lebender Hefe im daraus hergestellten sterilen Dauerpräparat wieder erhalten³⁾.

2. Nach der Schädigung durch antiseptische Mittel, wie Toluol, kann man die Hefenenzyme in zwei Gruppen teilen. Für die erste ist Invertase typisch: Lösungen isolierter Invertasepräparate werden durch Toluol nicht beeinflusst. Im

bemerkten v. Euler und af Ugglas (Zeitschr. f. allgem. Physiol. 12, 365, 1911) mit Recht: Ganz unabhängig davon, ob die Zymase in der lebenden Hefe frei oder gebunden ist, wird man sie immer als Enzym bezeichnen können, insofern Buchner einwandfrei gezeigt hat, daß die Gärwirkung der Hefe sich von der lebenden Zelle isolieren läßt.

¹⁾ Von Euler und af Ugglas, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 286, 1911; von Euler und S. Kullberg, ebenda 73, 90, 1911.

²⁾ Der Nachweis einer bedeutenden Verlangsamung des „Angärens“ ist für die Alkoholfällung im Vergleich mit dem frischen Hefepreßsaft bereits erbracht; s. Die Zymasegärung 1903, 235.

³⁾ Buchner und S. Skraup, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 47, 860, 1914.

Gegensatz dazu stehen die Zymasen: Auch hier sind nach von Euler die von der Zelle abgetrennten Enzyme unempfindlich gegen jenes Protoplasmagift. Tatsächlich wird die Gärung durch lebende Hefe dadurch stark geschwächt und oft vollständig aufgehoben, während die Gärung mit Trockenpräparaten viel weniger gehemmt wird¹⁾. Bei ersterer soll nach von Euler gleichzeitig mit der vitalen Tätigkeit der Zelle die Gärung erregende Gruppe des Plasmas inaktiviert werden²⁾.

Die eigenen Versuche von Euler und Kullbergs mit Trockenhefe zeigen aber, daß Toluol auch auf vollkommen sterile Trockenhefe eine erheblich hemmende Wirkung ausübt. Wie in der folgenden Abhandlung ausführlich bewiesen ist, sind Schädigungen in solchem Umfang allerdings nur festzustellen, wenn sich die Beobachtungen über einen verhältnismäßig kurzen Zeitraum von etwa zehn Stunden erstrecken; die durch Toluol anfänglich bewirkte Herabsetzung der Gärgeschwindigkeit wird nämlich bei längerer Versuchsdauer größtenteils wieder eingeholt. Eine geringe Hemmung der Gärwirkung steriler Trockenhefe durch Toluol bleibt aber doch bestehen; sie dürfte wahrscheinlich auf eine ungünstige Beeinflussung der Grenzschichten der Kolloidenzyme, auf eine Änderung der Oberflächenspannung der Zymase oder ihres Quellungszustandes zurückzuführen sein (s. die folgende Abhandlung).

Was aber den stark schädigenden Einfluß von Toluol auf die Gärwirkung lebender Hefe betrifft, so haben wir uns darüber erst vor kurzem ausführlich ausgesprochen³⁾; vermutlich versetzt das Eindringen von Toluol die Hefe in einen leidenden Zustand, wodurch das regelmäßige Spiel der Enzyme im Zellinnern in Unordnung gerät⁴⁾. Z. B. kann das antisept-

¹⁾ Von Euler und Beth af Ugglas, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 70, 288, 1911; von Euler und Kullberg, ebenda 73, 91, 1911; vgl. besonders auch von Euler, Abschnitt: Alkoholische Gärung, *Abderhaldens Fortschritte der Naturwissenschaften* 10, 68.

²⁾ Von Euler, Vortrag, *Kemistamfundet in Stockholm*, vgl. *Chem.-Zeitg.* 1916, 896.

³⁾ Buchner und S. Skraup, *Ber. d. Deutsch. chem. Ges.* 47, 858, 1914.

⁴⁾ In ähnlicher Vorstellung führt H. Pringsheim (*Biolog. Centralbl.* 33, 504, 1913) die Erscheinung auf eine Schädigung der osmotischen Verhältnisse der Zelle zurück. Möglicherweise wird der ungünstige

tische Mittel zum Beginn des Zellabbaues, zu einer übermäßig großen Produktion von Endotryptase und Lipase führen, eine Annahme, die wir durch einige Versuche stützen konnten¹⁾. Von Euler selbst hat festgestellt²⁾, „daß lebende Hefe, die unter normalen Umständen in phosphathaltigen Zuckerlösungen keine Veresterung bewirkt, bei Gegenwart von Toluol Phosphat schnell und in großer Menge an Kohlenhydrat bindet“, d. h. es findet auf Toluolzusatz eine ungewöhnlich große Bildung des zugehörigen Enzyms, der Phosphatase, statt. A. Harden und S. G. Paine³⁾ haben ferner beobachtet, daß Toluolzusatz die Selbstgärung der Hefezellen beschleunigt, was auf erhöhte Produktion von Glykogenase, dem Glykogen verzuckernden Enzym, hindeutet; sie bezeichnen es als möglich, daß hier außer der durch Toluol bewirkten Plasmolyse noch andere Faktoren, wie Desorganisation der Zellen oder Hormone-Wirkungen, hereinspielen.

Es sind also genügend Anhaltspunkte vorhanden, um die starke Wirkung von Toluol auf die Gärung durch lebende Hefe verständlich zu machen.

3. Die Extraktionsfähigkeit der Hefenenzyme steht mit dem Verhalten gegen Gifte in auffälliger Übereinstimmung; auch hier sind zwei Gruppen zu unterscheiden: die Invertase und ähnliche Enzyme lassen sich aus der getrockneten Hefe durch Wasser leicht ausziehen, während die Zymasen der Hefen immer nur in beschränktem Maße in wäßrige Lösung übergehen⁴⁾. Auch diese Verhältnisse werden von Euler dadurch zu erklären versucht, daß in der lebenden Hefe nur ein geringer Bruchteil des gärungsvermittelnden Agens in Form des freien Enzyms anwesend sei; der weit überwiegende Teil müsse in engerer Weise mit dem Protoplasma verbunden gedacht werden.

Einfluß des Toluols durch seine Anreicherung in den Zellen verstärkt, wie sie A. Dorner unter Leitung von O. Warburg für derartige Stoffe festgestellt hat (Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 101, 1912).

¹⁾ a. a. O. 859.

²⁾ Von Euler und D. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 80, 181, 1912.

³⁾ Proc. Roy. Soc., B, 84, 448, 1912.

⁴⁾ H. von Euler und D. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 80, 176, 1912; H. von Euler, Artikel: Alkoholische Gärung, Abderhaldens Fortschritte der Naturwissenschaften 10, 68.

Da die Extraktionsverhältnisse der Gärungsagenzien schon oben gelegentlich der Widerlegung der Ansichten Ruhlands eingehend erörtert sind, erübrigt sich eine Wiederholung.

4. Bei einer Erörterung über die biologische Rolle des Gärungsvorganges, also über die Frage, wie die Gärnergie der Hefezelle zugute kommt, weisen von Euler und af Ugglas¹⁾ darauf hin, daß eine direkte Beeinflussung zweier chemischen Reaktionen untereinander nur möglich ist, wenn sie mindestens eine Komponente gemeinsam haben. Als solche betrachten sie im vorliegenden Fall den Katalysator, der sowohl den Zuckerzerfall bei der Gärung, als z. B. den Eiweißaufbau oder einen ähnlichen Vorgang auslösen soll, d. h. sie nehmen an, daß eben das wirksame Enzym in beiden Fällen derselbe Stoff sei. Beim Aufbau des Körpereiß fungiere nun als Katalysator zweifellos das Protoplasma. Somit mache die Auffassung des Gärungsenzyms in der lebenden Hefe als Bestandteil des Protoplasmas „die biologische Tatsache verständlich, daß durch die Gärung bzw. die Atmung der Pflanzen die Reaktionen der Eiweißwandlung (bzw. ein Teil derselben) beschleunigt werden²⁾“. Wer sagt aber, daß die gemeinsame Komponente gerade der Katalysator sein muß? Sie kann ebensogut durch ein sehr reaktionsfähiges Zwischenprodukt des Zuckerzerfalles, z. B. irgendeinen Aldehyd od. dgl. dargestellt werden.

Auch Ruhland³⁾ will durch die Annahme einer *intra vitam* bestehenden Plasma-Zymase-Verbindung erklären, wie dann „durch Einbeziehung der reagierenden Stoffe in den molekularen Wirkungsbereich der Plasmabausteine den lebenden Teilchen die zweckentsprechende Transformation und Nutzbarmachung der fermentativ gewonnenen Energie für die vitale Arbeitsleistung unmittelbar zufallen wird“. Derartiges sei eben nur möglich „bei ganz unmittelbarem chemischem und regulatorischem Walten des Plasmas, in dem der Apparat für zweckmäßige Transformation zu erblicken ist⁴⁾“.

¹⁾ Zeitschr. f. allgem. Physiol. 12, 372, 1911; vgl. auch v. Euler und Lindner, Chemie der Hefe 1915, 249.

²⁾ Zeitschr. f. allgem. Physiol. 12, 376, 1911.

³⁾ Jahrb. wiss. Botanik 54, 437, 1914.

⁴⁾ Eine ganz ähnliche Auffassung vertritt auch M. Rubner, Ernährungsphysiologie der Hefezelle, Arch. f. Physiol., Suppl.-Bd. 1913, 51;

Wir gestehen, daß es uns verfehlt vorkommen würde, wollte man aus solchen theoretischen Erwägungen allein die Bindung des Gärungszyms an das lebende Plasma folgern. Soweit die experimentellen Tatsachen reichen, ist aber, wie wir gezeigt haben, eine derartige Annahme zurzeit entbehrlich. Ohne zwingenden Grund kann es nicht als empfehlenswert bezeichnet werden, alle abtrennbaren Funktionen wieder in das lebende Plasma hinein zu geheimnissen.

Experimentelles.

Bei den im folgenden beschriebenen Zerreibungsversuchen kam eine Kugelmühle aus Porzellan mit etwa 60 Hartporzellan-kugeln von 3 cm Durchmesser zur Verwendung, die durch einen mechanischen Antrieb etwa jede Sekunde eine Umdrehung vollführte. Die Aceton-Dauerhefe wurde nach der früher gegebenen Vorschrift dargestellt¹⁾, doch zeigte sich bei ausführlichen Versuchen, daß das Eintragen der abgepreßten Hefe in das Aceton ohne Anwendung eines Siebes, also direkt, erfolgen kann, ohne daß dadurch eine Schädigung des Präparates eintritt. Die Lebedew-Hefe wurde nach den Angaben von A. von Lebedew²⁾ dargestellt, bzw. sofern es sich um Münchener Unterhefe handelte, von A. Schroder, München, Landwehrstraße 45, bezogen. Die Gärkraftbestimmungen, wie früher auf gewichtsanalytischem Wege ausgeführt, erfolgten immer in zwei Parallelversuchen, unter Toluolzusatz und bei einer Versuchstemperatur von 22°. Die in den letzten Spalten der Tabellen aufgeführte Endzahl gibt die Kohlendioxydmenge bei Stillstand des Gärungsvorganges wieder; der Zeitpunkt dafür wechselte etwa zwischen 5 und 14 Tagen.

Einfluß der Zerreibung der Trockenhefen auf die Gärwirkung.

Zunächst seien die Beweise dafür angeführt, daß Zerreiben in der Kugelmühle keinen schädlichen Einfluß auf

wir haben uns dazu bereits geäußert (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 47, 863, 1914); kritische Bemerkungen darüber liegen ferner vor von H. Pringsheim, *Biolog. Centralbl.* 33, 502, 1913.

¹⁾ Albert, Buchner und Rapp, *Ber. d. Deutsch. chem. Ges.* 35, 2378, 1902.

²⁾ *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 73, 447, 1911.

die Gärwirkung ausübt. Infolge der mechanischen Anordnung verläuft diese Art des Pulverisierens sehr gleichmäßig und im Gegensatz zum Zerreiben in der Porzellanschale ohne größere Temperaturerhöhung¹⁾. Die Tabelle I gibt drei Versuche wieder, von denen der erste und letzte mit Aceton-Dauerhefe und Lebedew-Hefe, hergestellt aus jedesmal derselben Würzburger Unterhefe, der zweite aber mit Lebedew-Hefe aus Münchener Unterhefe ausgeführt wurde. Neben der Gärwirkung des unzerriebenen Präparates wurde die Wirkung der mit $\frac{1}{5}$ des Gewichtes Kieselgur zerriebenen Trockenhefen und in zwei Fällen auch die Wirkung der ohne Zusatz²⁾ zerriebenen Präparate bestimmt.

Es ergab sich, daß durch das Zerreiben keine wesentliche Änderung der Gärwirkung herbeigeführt wird³⁾. Bei der Aceton-Dauerhefe war in einem Falle eine geringfügige Steigerung, im andern Falle keine deutliche Beeinflussung festzustellen. Bei der Lebedew-Hefe führte das Zerreiben ständig zu einer kleinen Verschlechterung der Wirkung, die im Maximum 27% erreichte und vielleicht bei der durch das Pulvern stark vergrößerten Oberfläche auf Adsorptionserscheinungen zurückzuführen ist. Ob das Zerreiben mit oder ohne Kieselgurzusatz erfolgt, erwies sich in den untersuchten drei Fällen ohne wesentliche Bedeutung; der Zusatz wirkt eher ungünstig, wohl infolge der vermehrten Oberfläche. Daß Kieselgur für sich die Adsorption nicht übermäßig beeinflußt, haben wir durch einen besonderen Versuch festgestellt (s. Tabelle VI).

Als Versuch 4 ist der Tabelle I endlich die Gärwirkung einer unzerriebenen Lebedew-Hefe angefügt, die von Herrn Prof. Dr. M. W. Beijerinck in Delft uns freundlichst zugesandt und, wie oben schon erwähnt, aus einer Unterhefe der Bierbrauerei d'Oranjeboom zu Rotterdam hergestellt worden war.

¹⁾ Buchner und Antoni, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 217, 1905.

²⁾ Während alle Aceton-Dauerhefen ohne Zusatz zerrieben werden können, verschmieren manche Lebedew-Hefen beim Pulverisieren ohne Kieselgur, offenbar infolge der schleimigen Beschaffenheit des Ausgangsmaterials.

³⁾ In Übereinstimmung damit berichten auch von Euler und af Ugglas (Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 286, 1911), daß der Einfluß des Zerreibens einer Dauerhefe auf die Gärkraft ein recht geringer sei.

Die mehlartige, sehr feinpulverige Probe enthielt nach unserer Bestimmung 4,13% Wasser und lieferte die normale Menge Kohlendioxyd. Merkwürdigerweise wies diese Trockenhefe auch ohne Zerreibung schon sehr viele geöffnete Zellen auf (s. Tabelle II).

Tabelle I.

Gärwirkung der Trockenhefen vor und nach Zerreiben in der Kugelmühle.
Je 2,0 g Hefepräparat + 4 g Rohrzucker + 0,2 g Toluol + 10 ccm Wasser; 22°.
Zerrieben je 6 Stunden.

Nr. des Versuchs	Versuchstag	Angewandte Hefeart	Vorbehandlung der Trockenhefe	Aceton-Dauerhefe			Lebedew-Hefe		
				geben Kohlendioxyd in g nach Tagen					
				1	3	Endzahl	1	3	Endzahl
1	16. X. 16.	Würzburger Unterhefe	unzerrieben	0,16	0,41	0,54	0,27	0,79	0,91
				0,17	0,42	0,54	0,27	0,78	0,90
			mit Kieselgur zerrieben	0,10	0,35	0,65	0,17	0,53	0,86
				0,11	0,36	0,64	0,17	0,53	0,85
2	4. XII. 16.	Münchener Unterhefe	unzerrieben	—	—	—	0,32	0,84	1,07
						0,34	0,89	1,13	
			ohne Zusatz zerrieben	—	—	—	0,25	0,59	—
						0,23	0,59	0,89	
		mit Kieselgur zerrieben	—	—	—	0,21	0,53	—	
					0,20	0,51	0,80		
3	18. XII. 16.	Würzburger Unterhefe	unzerrieben	0,15	0,44	0,49	0,24	0,77	0,85
				0,15	0,44	0,50	0,25	0,77	0,84
			ohne Zusatz zerrieben	0,15	0,46	0,52	0,18	0,56	0,65
				0,15	0,44	0,51	0,19	0,57	0,66
			mit Kieselgur zerrieben	0,14	0,42	0,48	0,18	0,58	0,68
				0,12	0,37	0,44	0,18	0,58	0,68
4	6. XII. 16.	Rotterdammer Unterhefe	unzerrieben	—	—	—	0,14	0,57	0,84
				—	—	—	0,15	0,57	0,83

Mikroskopische Prüfung der zerriebenen Trockenhefen.

Um ein Urteil über den Grad der Zerreibung zu gewinnen, wurden sowohl von Aceton-Dauerhefe als von Lebedew-Hefe unzerriebene und mit bzw. ohne Kieselgur 6 Stunden lang in der Kugelmühle zerriebene Präparate mikroskopisch untersucht. Hierzu blieben die Proben vorher mehrere Stunden unter Wasser stehen, dem etwas Toluol zugesetzt war. Um die Differenzierung zu erleichtern, wurde mit Methylenblau gefärbt.

Die Ergebnisse sind in den drei letzten Spalten der Tabelle II aufgeführt; die drittletzte Spalte enthält die Gesamtzahl der beim Absuchen von durchschnittlich 10 Gesichtsfeldern gezählten Zellen, die vorletzte Spalte gibt die Prozentzahl der unveränderten Zellen wieder, also von solchen mit deutlich sichtbarer Zellhaut von regelmäßig elliptischem Umfang, wogegen die letzte Spalte die verletzten Zellen, d. h. seitlich gedrückte und eckig gewordene Zellen und Stücke von solchen, deren Zahl allerdings nur schätzungsweise feststellbar ist, enthält.

Tabelle II.

Zertrümmerung der Trockenhefen in der Kugelmühle.
 Mikroskopische Prüfung der gefärbten Hefepräparate vor und nach dem Zerreiben.

Nr. des Versuchs	Versuchstag	Hefeart	Trocken-Hefe	Art der Vorbehandlung	Gesamtzahl der gezählten Zellen	Davon	
						unveränderte Zellen	verletzte Zellen und Stücke v. solchen
1	17. X. 16	Würzburger Unterhefe	Aceton-Dauerhefe	unzerrieben mit Kieselgur zerrieben	168 204	100 % 17 "	— % 83 "
			Lebedew-Hefe	unzerrieben mit Kieselgur zerrieben	277 152	99 " 24 "	1 " 76 "
			Aceton-Dauerhefe	ohne Zusatz zerrieben	262	36 "	64 "
3	31. X. 16		Aceton-Dauerhefe	unzerrieben ohne Zusatz zerrieben	79 69	96 " 23 "	4 " 77 "
				mit Kieselgur zerrieben	52	19 "	81 "
4	6. XII. 16		Rotterdammer Unterhefe	Lebedew-Hefe	unzerrieben	231	34 "

Durchschnittlich blieben nach dem Zerreiben etwa $\frac{1}{4}$ der Zellen unverändert; zwischen Aceton-Dauerhefe und Lebedew-Hefe war kein wesentlicher Unterschied. Ebenso erwies sich Kieselgurzusatz beim Zerreiben ohne großen Einfluß. Die nicht zerriebenen Präparate von Würzburger Hefe (und ebenso in

zahlreich untersuchten Fällen von Münchener Unterhefe) zeigten, wie zu erwarten, nur unveränderte Zellen, abgesehen von Versuch 3, bei dem ein paar Zellen offenbar schon vor der Acetonbehandlung verletzt waren.

In völligem Gegensatz dazu zeigte die schon mehrfach erwähnte, unter Nr. 4 aufgeführte Lebedew-Hefe, die uns von Herrn Prof. M. W. Beijerinck, Delft, zugesandt worden war, schon ohne Zerreibung $\frac{2}{3}$ verletzte Zellen, größtenteils bereits ohne Membran. Diese Hefe scheint eine derartig zarte Membran zu besitzen, daß sie schon beim Austrocknen eine zur Zerreibung führende Schrumpfung erleidet. Derartiges haben wir weder bei Würzburger noch bei Münchener Unterhefen jemals beobachten können.

Extrahierbarkeit unzerriebener und zerriebener Aceton-Dauerhefen.

Die Tabelle III gibt die Gärwirkung von Auszügen aus Aceton-Dauerhefen vor und nach dem Zerreiben wieder. Ausgangsmaterial bildete bei allen Versuchen Würzburger untergärige Bierhefe. Das Zerreiben wurde bei den ersten beiden Versuchen mit der Hand in einer Reibschale während 10 Minuten ausgeführt. Da aber die mikroskopische Prüfung hier nach nur eine sehr geringe Zahl von verletzten Zellen erkennen ließ (unter 1%) und zugleich Bedenken wegen bei diesem Verfahren lokal möglichem Überhitzen sich einstellten, wurde bei allen übrigen Versuchen mit der Kugelmühle gepulvert. Nachdem bei Versuch 3 mit halbstündigem Zermahlen mikroskopisch nur wenige verletzte Zellen nachweisbar waren, wurde bei 4 acht Stunden lang in der Mühle zerrieben; nun zeigte sich, daß alle Zellen zertrümmert waren; die Gärwirkung des Auszuges erwies sich aber als nicht sehr hoch, vielleicht infolge Adsorptionswirkung der übermäßig vielen Splitter und Bruchstücke. Bei Versuch 5 wurde deshalb nur vier Stunden und bei 6 und 7 jedesmal sechs Stunden als der wahrscheinlich optimalen Zeitdauer zerrieben.

Zur Herstellung der Auszüge wurde die Aceton-Dauerhefe bzw. deren Mahlgut mit oder ohne $\frac{1}{5}$ ihres Gewichtes an Kieselgur nunmehr mit der vierfachen Menge Wasser angerührt und 7 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Ab-

trennung des Auszuges vom Ungelösten erfolgte bei den Versuchen 1 bis 6 und 8 durch 16stündige Filtration bei niedriger Temperatur (4—5°) durch ein gewöhnliches Filter (sog. Macerationssaft, Verfahren nach von Lebedew), bei den Versuchen 7 und 9 dagegen durch Zentrifugieren ($\frac{1}{2}$ Stunde bei 2700 Umdrehungen in der Minute), was keine wahrnehmbaren Unterschiede herbeiführte. Von den erhaltenen Auszügen wurden dann zur Gärkraftbestimmung je 20 ccm mit 8 g Saccharose und 0,3 ccm Toluol versetzt und der Gewichtsverlust bei 22° bestimmt. Während nun die Auszüge aus den zerriebenen Präparaten alle deutliche und zum Teil sehr starke Kohlendioxydentwicklung aufwiesen, wobei es nach Versuch 7 ohne größeren Einfluß bleibt, ob ohne oder mit Kieselgurzusatz zerrieben wird¹⁾, ergaben die Versuche 1 bis 7 neben einigen unveröffentlichten als gleichmäßigen Befund, daß die Auszüge aus der gewöhnlichen unzerriebenen Aceton-Dauerhefe keine oder nur sehr schwache Gärwirkung besitzen²⁾.

Dagegen sind nun unter Nr. 8 und 9 zwei Fälle beschrieben, wo auch bei direkter Extraktion der unzerriebenen Aceton-Dauerhefe kräftig wirkende Auszüge erhalten wurden. Diese beiden Versuche stellen daher eine erhebliche Ausnahme gegenüber der Regel dar, die vermutlich mit einer ungewöhnlichen Beschaffenheit der betreffenden Hefen zusammenhängt. Es handelte sich in beiden Fällen um Würzburger Unterhefe, die leider mikroskopisch nicht untersucht worden war. Bei Versuch 8 wurde die Zerreibung in der Reibschale mit der Hand 10 Minuten lang unter Zusatz von Quarzsand und unter Anfeuchtung mit Wasser ausgeführt, was sich für die Gärwirkung als sehr schädlich erwies; es war dies der erste Versuch der ganzen Reihe. Bei Versuch 9 hatten auch die zerriebenen Präparate besonders starke Gärwirkung, so daß die Wirkung der Auszüge aus dem unzerriebenen Präparat nur einen kleinen Teil der in dieser Aceton-Dauerhefe im ganzen vorhandenen darstellt.

¹⁾ Eine geringfügige Verschlechterung infolge des Kieselgurzusatzes war immerhin wahrzunehmen und dürfte auf die erhöhte Adsorptionswirkung zurückzuführen sein (vgl. Tabelle VI).

²⁾ Infolge etwas schwankender Ausbeuten an Saft sind die Zahlen der Tabelle streng nur innerhalb ein und desselben Versuches vergleichbar.

Tabelle III.

Gärwirkung von Auszügen aus Aceton-Dauerhefen vor und nach dem Zerreiben,

Je 20 ccm Extrakt + 8 g Rohrzucker + 0,3 g Toluol; 22°.

Nr. d. Versuchs	Versuchstag	Hefeart	Behandlung der Aceton-Dauerhefe	Art der Zerreibung	Dauer	Auszug abgetrennt durch	20 ccm Auszug gaben Kohlendioxyd in g nach Tagen		
							1	3	Endzahl
1	22. V. 16	Würzburger Unterhefe	unzerrieben	In Reibschale mit der Hand trocken zerrieben	10 Min.	Filterieren	0,07	0,15	0,18
			mit Kieselgur zerrieben				0,06	0,14	0,17
2	29. V. 16		unzerrieben	10 Min.	0,04		0,09	0,11	
			mit Kieselgur zerrieben		0,04		0,09	0,11	
3	5. VI. 16		unzerrieben	1/2 Std.	0,03		0,05	0,07	
			mit Kieselgur zerrieben		0,03		0,03	0,03	
4	11. VII. 16		unzerrieben	8 Std.	0,30		0,56	0,57	
			mit Kieselgur zerrieben		0,31		0,56	0,57	
5	9. X. 16		unzerrieben	Mit Kugelmühle trocken zerrieben	4 Std.		0,02	0,05	0,07
			mit Kieselgur zerrieben				0,03	0,06	0,07
6	16. X. 16	unzerrieben	6 Std.	6 Std.	0,38	0,73	0,75		
		mit Kieselgur zerrieben			0,39	0,74	0,76		
7	9. I. 17	unzerrieben	6 Std.	Zentrifugieren	0,04	0,06	0,07		
		ohne Zusatz zerrieb.			0,03	0,04	0,05		
8	3. V. 16	unzerrieben	Durchfeuchtet in Reibschale mit der Hand	10 Min.	Filterieren	0,02	0,03	0,05	
		mit Sand zerrieben				0,01	0,02	0,04	
9	30. X. 16	unzerrieben	Mit Kugelmühle trocken zerrieben	6 Std.	Zentrifugieren	0,29	0,86	1,29	
		ohne Zusatz zerrieb.				0,29	0,85	1,29	
9	30. X. 16	unzerrieben	6 Std.	Zentrifugieren	0,32	0,91	1,20		
		ohne Zusatz zerrieb.			0,32	0,89	1,18		
9	30. X. 16	unzerrieben	Mit Kugelmühle trocken zerrieben	6 Std.	Zentrifugieren	0,08	0,23	0,52	
		ohne Zusatz zerrieb.				0,09	0,24	0,52	
9	30. X. 16	unzerrieben	Mit Kugelmühle trocken zerrieben	6 Std.	Zentrifugieren	0,08	0,12	0,12	
		ohne Zusatz zerrieb.				0,08	0,12	0,12	
9	30. X. 16	unzerrieben	Mit Kugelmühle trocken zerrieben	6 Std.	Zentrifugieren	0,06	0,16	0,36	
		ohne Zusatz zerrieb.				0,07	0,17	0,38	
9	30. X. 16	unzerrieben	Mit Kugelmühle trocken zerrieben	6 Std.	Zentrifugieren	1,00	1,85	1,93	
		ohne Zusatz zerrieb.				1,06	1,95	2,03	
9	30. X. 16	unzerrieben	Mit Kugelmühle trocken zerrieben	6 Std.	Zentrifugieren	0,77	1,25	1,25	
		ohne Zusatz zerrieb.				0,76	1,25	1,25	

**Extrahierbarkeit unzerriebener und zerriebener
Lebedew-Hefe.**

Die hierher gehörigen Arbeiten (s. Tabelle IV) sind übereinstimmend mit den Extraktionsversuchen mit Aceton-Dauerhefe (s. Tabelle III) ausgeführt, so daß bezüglich der Art des Zerreibens und der Herstellung der Auszüge direkt auf die dort gemachten Angaben verwiesen werden kann¹⁾. Auch das verwendete Hefematerial war in mehreren Fällen das gleiche wie bei der Darstellung der Aceton-Dauerhefen von Tabelle III, was im einzelnen Falle aus der Übereinstimmung der Versuchstage zu ersehen ist.

Das Zerreiben in der Reibschale (Versuche 1 und 2) zeigte sich als ungünstig für die Beschaffenheit der Auszüge. Auch das Zerreiben in der Kugelmühle lieferte bei den Versuchen 3 und 5 bis 7 keine wesentliche Verbesserung der Wirksamkeit der Auszüge. Bei Versuch 4 war die Gärkraft des zerriebenen Präparats auffallend heruntergegangen, was wohl als Adsorptionswirkung des außerordentlich feingepulverten Mahlgutes gedeutet werden darf. Kieselgurzusatz beim Zerreiben ist meistens von geringer Schädigung begleitet. Dagegen ergaben die Versuche 1 bis 8 übereinstimmend gut wirksame Auszüge direkt aus den unzerriebenen Lebedew-Hefen, ganz im Gegensatz zu dem beschriebenen Verhalten der Aceton-Dauerhefe bei der gleichen Behandlung.

Merkwürdigerweise lieferten aber zwei Lebedew-Hefen, die in letzter Zeit aus Würzburger bzw. Münchener Unterhefe von uns bzw. A. Schroder dargestellt worden sind, unzerrieben unwirksame Säfte, wogegen nach der Zerreibung gärkräftige Auszüge erhalten wurden (Versuche 9 und 10 ausgeführt mit derselben Würzburger Unterhefe und 11 mit Münchener Hefe); vielleicht steht die mit der Erniedrigung der Stammwürze verbundene mangelhafte Kriegsernährung der Unterhefe damit in irgendeiner Beziehung.

Endlich sei noch darauf hingewiesen, daß die Versuche 7 und 8 mit derselben Lebedew-Hefe (aus Münchener Unterhefe) ausgeführt sind, welche bei 8 nur 54 Tage länger gelagert war.

¹⁾ Vgl. auch Buchner, Langheld und Skraup, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 47, 2551, 1914.

Tabelle IV.

Gärwirkung von Auszügen aus Lebedew-Hefen vor und nach dem Zerreiben.
Je 20 ccm Saft + 8 g Rohrzucker + 0,3 g Toluol; 22°.

Nr. d. Versuchs	Versuchstag	Hefeart	Behandlung der Lebedew-Hefe	Art der Zerreibung	Dauer	Saft hergestellt durch	20 ccm Auszug gaben Kohlendioxyd in g nach Tagen		
							1	3	Endzahl
1	22. V. 16	Würzburger Unterhefe	unzerrieben	In Reibschale mit der Hand trocken	10 Min.	Filterieren	1,14	1,87	1,99
			mit Kieselgur zerrieben				1,11	1,83	1,95
2	29. V. 16		unzerrieben	10 Min.	0,99		1,32	1,32	
			mit Kieselgur zerrieben		0,98		1,32	1,32	
3	5. VI. 16		unzerrieben	$\frac{1}{2}$ Std.	1,10		2,02	2,17	
			mit Kieselgur zerrieben		1,10		1,94	2,09	
4	11. VII. 16		unzerrieben	8 Std.	0,87		1,60	1,65	
			mit Kieselgur zerrieben		0,88		1,51	1,57	
5	9. X. 16		unzerrieben	4 Std.	1,05		1,40	1,43	
			mit Kieselgur zerrieben		1,01		1,39	1,42	
6	16. X. 16.		unzerrieben	mit der Kugelmühle trocken	1,09		1,56	1,57	
			mit Kieselgur zerrieben		1,03		1,60	1,62	
7	4. XII. 16		unzerrieben	6 Std.	0,43		0,75	0,85	
			ohne Zusatz zerrieb.		0,45		0,76	0,80	
8	29. I. 17	unzerrieben	6 Std.	0,02	0,05	0,08			
		mit Kieselgur zerrieben		0,01	0,02	0,04			
7	4. XII. 16	unzerrieben	6 Std.	0,69	1,16	1,18			
		mit Kieselgur zerrieben		0,70	1,14	1,16			
8	29. I. 17	unzerrieben	6 Std.	0,55	1,21	1,29			
		mit Kieselgur zerrieben		0,52	1,39	1,48			
7	4. XII. 16	unzerrieben	6 Std.	0,62	1,07	1,11			
		mit Kieselgur zerrieben		0,54	—	—			
8	29. I. 17	unzerrieben	6 Std.	0,46	0,94	1,13			
		ohne Zusatz zerrieb.		0,45	0,96	1,14			
7	4. XII. 16	unzerrieben	6 Std.	0,59	1,56	1,96			
		ohne Zusatz zerrieb.		0,64	1,63	2,02			
8	29. I. 17	unzerrieben	6 Std.	0,56	1,48	1,83			
		mit Kieselgur zerrieben		0,58	1,49	1,86			
8	29. I. 17	unzerrieben	6 Std.	0,57	1,45	1,68			
		ohne Zusatz zerrieb.		0,56	1,44	1,78			
8	29. I. 17	unzerrieben	6 Std.	0,37	0,96	1,20			
		mit Kieselgur zerrieben		0,39	1,06	1,55			
8	29. I. 17	unzerrieben	6 Std.	0,41	1,08	1,58			
		ohne Zusatz zerrieb.		0,42	1,09	1,58			
8	29. I. 17	unzerrieben	6 Std.	0,57	1,42	1,91			
		mit Kieselgur zerrieben		0,56	1,42	1,90			

Tabelle IV. [Fortsetzung.]

Gärwirkung von Auszügen aus Lebedew-Hefen vor und nach dem Zerreiben.
Je 20 ccm Saft + 8 g Rohrzucker + 0,3 g Toluol; 22°.

Nr. d. Versuchs	Versuchstag	Hefeart	Behandlung der Lebedew-Hefe	Art der Zerreibung	Dauer	Saft hergestellt durch	20 ccm Auszug gaben Kohlendioxyd in g nach Tagen		
							1	3	Endzahl
9	9. I. 17	Würzburger Unterhefe	unzerrieben	mit der Kugelmühle trocken	6 Std.	Zentrifugieren	0,01	0,01	0,01
			ohne Zusatz zerrieb.				0,01	0,01	0,01
			mit Kieselgur zerrieben				0,40	1,19	1,65
							0,41	1,17	1,64
10	15. I. 17	Würzburger Unterhefe	unzerrieben	mit der Kugelmühle trocken	—	Zentrifugieren	0,38	1,02	1,41
							0,36	1,00	1,37
11	23. I. 17	Münchener Unterhefe	unzerrieben	mit der Kugelmühle trocken	6 Std.	Zentrifugieren	0,01	0,01	0,01
			ohne Zusatz zerrieb.				0,01	0,01	0,01
		Münchener Unterhefe	unzerrieben	mit der Kugelmühle trocken	6 Std.	Zentrifugieren	0,00	0,00	0,00
			ohne Zusatz zerrieb.				0,01	0,01	0,01
			mit Kieselgur zerrieben				0,31	0,73	0,80
							0,31	0,71	0,79
							0,31	0,67	0,71
							0,29	0,64	0,68

Diese ergab unzerrieben wesentlich schwächer gärwirksamen Auszug, wogegen bei den Extraktionsversuchen mit den zerriebenen Präparaten keine so deutlichen Unterschiede hervortraten. Nachdem der Wassergehalt des in einer Blechbüchse aufbewahrten Präparates sich nicht geändert hatte (September 1916: 4,8% Wasser, Dezember 1916: 4,9% Wasser gefunden), kann es sich dabei wohl nur um eine innere Zustandsänderung (Entquellung) handeln.

Gerinnbares Eiweiß und Endotryptase in den Auszügen aus Trockenhefen.

Um ein Urteil über die Extrahierbarkeit der Trockenhefen zu gewinnen, wurden die Auszüge aus Aceton-Dauerhefe und aus Lebedew-Hefe auch auf Gerinnbarkeit und Verflüssigungsvermögen gegenüber Gelatine geprüft (Tabelle V). Die Auszüge sind nach den schon beschriebenen Methoden hergestellt und mit den obenerwähnten (s. Tabelle III und IV) identisch, wie es jeweils wieder aus den Versuchstagen hervorgeht. Zur Bestimmung des koagulierbaren Eiweißes wurden je 5—10 ccm

Tabelle V.
Koagulierbares Eiweiß und Verdauungsenzyme in Auszügen aus Trockenhefen.

Fällung des Koagulates durch Aufkochen von je 5—10 ccm der Auszüge unter den üblichen Zusätzen. Gelatineverflüssigung: je 2 $\frac{1}{2}$ ccm Auszug + 0,1 ccm Toluol aufgeschichtet auf 5 ccm Gelatine; 22°. Zerreibung der Trockenhefen 6 Std. in der Kugelmühle (bei Nr. 1 nur 4 Std.).

Nr. d. Versuchs	Versuchstag	Hefeart	Behandlung der Trockenhefen	Auszug abgetrennt durch	°/o Eiweißgerinnel im Auszug aus		Prozentgehalt der Gelatine	ccm verflüssigte Gelatine durch 2 $\frac{1}{2}$ ccm Auszug aus			
					Aceton-Dauerhefe	Lebedew-Hefe		Aceton-Dauerhefe		Lebedew-Hefe	
								nach 4 Tagen	Endzahl	nach 4 Tagen	Endzahl
1	9. X. 16	Würzburger Unterhefe	unzerrieben	Filterieren	Spuren	5,5	9°/o	0,4	1,6	0,9	2,9
			mit Kieselgur zerrieben		3,6	6,6		0,4	1,5	1,1	3,2
2	16. X. 16	Würzburger Unterhefe	unzerrieben	Filterieren	Spuren	3,7	9°/o	0,4	1,6	1,2	3,8
			mit Kieselgur zerrieben		3,6	3,4		0,3	1,6	1,0	3,5
3	30. X. 16	Würzburger Unterhefe	unzerrieben	Zentrifugieren	Spuren	—	4 $\frac{1}{2}$ °/o	1,1	2,8	—	—
			ohne Zusatz zerrieben		5,0	—		1,0	2,6	—	—
			mit Kieselgur zerrieben		4,4	—		3,9	5 $\frac{1}{2}$)	—	—
4	4. XII. 16	Münchener Unterhefe	unzerrieben	Zentrifugieren	—	4,0	4 $\frac{1}{2}$ °/o	4,0	5 $\frac{1}{2}$)	—	—
			ohne Zusatz zerrieben		—	4,7		4,3	5 $\frac{1}{2}$)	—	—
			mit Kieselgur zerrieben		—	5,2		4,3	5 $\frac{1}{2}$)	—	—
5	29. I. 17	Münchener Unterhefe	unzerrieben	Zentrifugieren	—	3,3	4 $\frac{1}{2}$ °/o	—	—	0,3	1,3
			ohne Zusatz zerrieben		—	4,4		—	—	0,3	1,2
			mit Kieselgur zerrieben		—	5,2		—	—	0,2	0,2
6	9. I. 17	Würzburger Unterhefe	unzerrieben	Zentrifugieren	Spuren	2,1	4 $\frac{1}{2}$ °/o	0,0	0,3	1,7	2,4
			ohne Zusatz zerrieben		2,0	4,1		0,0	0,4	1,8	2,5
			mit Kieselgur zerrieben		2,0	3,8		1,6	2,4	1,2	2,1
7	23. I. 17	Münchener Unterhefe	unzerrieben	Zentrifugieren	—	2,7	4 $\frac{1}{2}$ °/o	1,7	2,5	1,1	2,0
			ohne Zusatz zerrieben		—	3,1		1,6	2,7	1,2	2,0
			mit Kieselgur zerrieben		—	3,2		1,7	2,8	1,2	2,3

1) Hier war vollständige Verflüssigung der Gelatine eingetreten.

mit Wasser verdünnt und unter Zusatz von Kochsalz und Essigsäure aufgeköcht¹⁾. Dabei ergaben die Auszüge aus unzerriebener Aceton-Dauerhefe übereinstimmend alle nur unwägbarbare Spuren von Gerinnsel, während nach dem Zerreiben hergestellte Auszüge bis zu 5% Koagulat aufwiesen. Die Lebedew-Hefen lieferten aber schon in unzerriebenem Zustande Extrakte, welche große Mengen von gerinnbarem Eiweiß enthielten, was durch vorhergehendes Zerreiben mit oder ohne Kieselgur meistens wenig geändert wurde.

Ähnlich große Unterschiede zeigten die Auszüge aus beiden Trockenhefen bezüglich des Gehaltes an Endotryptase. Zur Feststellung desselben wurden je 2,5 ccm der Extrakte unter Zusatz von 0,1 ccm Toluol aufgeschichtet auf 5 ccm einer 9- bzw. 4,5%igen, unter Toluolzusatz hergestellten Gelatine, welche in kleine Meßzylinderchen von etwa 1 cm Durchmesser eingefüllt, vor der Verwendung jedesmal ungefähr einen Tag zur völligen Erstarrung gestanden hatten; während des Versuches waren die Zylinderchen durch Korkstopfen verschlossen. Bei 22° beginnt dann die Verflüssigung, am Meniscus der Gelatine direkt abzulesen, gewöhnlich erst nach einigen Tagen. Anfangs ist dabei häufig eine vorübergehende Erhöhung des Meniscus wahrzunehmen, zurückzuführen offenbar auf eine Quellung der Gelatine. Die Versuche wurden nach 7—17 Tagen abgebrochen. Die Verflüssigung erfolgt hierbei streng von obenher schichtenweise, was anzeigt, daß die Endotryptase keine erheblichen Strecken in die Gelatine hineindiffundiert.

Die unzerriebene Aceton-Dauerhefe ergab wieder nur wenig wirksame Auszüge, während die zerriebene, ziemlich gleichgültig, ob mit oder ohne Zusatz von Kieselgur gepulvert wurde, stark verflüssigende Extrakte lieferte. Auszüge aus unzerriebener Lebedew-Hefe wiesen dagegen hohen Endotryptasegehalt auf, der durch vorhergehendes Zerreiben der Trockenhefe, mit oder ohne Kieselgurzusatz, nicht verbessert, sondern meistens herabgedrückt wurde, wahrscheinlich infolge Adsorption. Die zerriebene Aceton-Dauerhefe gab gewöhnlich ebenso wirksame Extrakte als unzerriebene Lebedew-Hefe.

Bemerkt sei noch, daß die Versuche 1 und 2 mit den-

¹⁾ M. Hahn und Geret, Zeitschr. f. Biol. 40, 125, 1900; E. und H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung 1903, 294.

selben Trockenhefen ausgeführt wurden, die bei 2 nur eine Woche länger gelagert war; sie geben also Anhaltspunkte für die Genauigkeit der Bestimmungen des koagulierbaren Eiweiß und der Gelatineverflüssigung. Auch zu den Versuchen 4 und 5 kam die gleiche Lebedew-Hefe zur Verwendung, welche bei 5 nur 54 Tage länger gelagert hatte; während die Koagulate der beiden Auszüge ziemlich gleichen Umfang aufwiesen, war der Endotryptasegehalt beim Auszug aus der länger aufbewahrten Lebedew-Hefe stark gesunken, was in gleicher Weise für die Auszüge aus der unzerriebenen wie aus der zerriebenen Trockenhefe gilt; es dürfte sich wohl um eine Schwächung der Endotryptase durch Änderung des Quellungszustandes handeln.

Adsorptionswirkung von Kieselgur und Aluminiumhydroxyd auf die Gärungsenzyme.

Da der Zusatz von Kieselgur beim Zerreiben von Trockenhefen, wie schon mehrfach erwähnt, im allgemeinen eine etwas schädigende Wirkung gezeigt hatte, schien es wünschenswert, festzustellen, ob dieser Substanz eine besondere spezifische Wirkung auf die Zymase zukommt. Es wurde also die Gärwirkung eines Auszuges aus Lebedew-Hefe nach $1\frac{1}{2}$ stündigem Schütteln in der Maschine mit Kieselgur bzw. mit Aluminiumhydroxyd (purissimum, Merck), die beide vorher in der Kugelmühle 3 Stunden gemahlen waren, bestimmt. Zum Vergleich wurde ferner ein Teil des Extraktes ohne Zusatz für sich ebenso lange geschüttelt. Die Versuche (s. Tabelle VI) ergaben eine

Tabelle VI.

Beeinflußt Schütteln mit Kieselgur oder Aluminiumhydroxyd die Gärwirkung von Macerationssaft?
Je 20 ccm Saft + 8 g Rohrzucker + 0,3 g Toluol; 22°.

Versuchstag	Hefeart	Vorbehandlung des Macerationssaftes	Kohlendioxyd in g nach Tagen		
			1	3	Endzahl
6. XI. 16	Münchener Unterhefe	für sich geschüttelt	0,86	1,57	1,61
			0,85	1,59	1,62
		mit Kieselgur geschüttelt	0,74	1,18	1,19
			0,74	1,24	1,24
		mit Aluminiumhydroxyd geschüttelt	0,69	1,06	1,08
			0,70	1,05	1,07

beträchtliche Herabsetzung der Gärwirkung um etwa $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$, vermutlich infolge von Adsorptionerscheinungen. Dabei wirkte das basische Aluminiumhydroxyd noch etwas schädlicher als die saure Kieselgur; eine spezifisch ungünstige Wirkung wird also von letzterer nicht ausgehen.

Austritt der Gärungsenzyme nach Abkühlung von Hefe mit flüssiger Luft und Wiederauftauen.

Dixon und Atkins¹⁾ haben einen Versuch beschrieben, nach welchem aus Hefe durch Eintauchen in flüssige Luft, Auftauen und Zentrifugieren leicht ein angeblich sehr gärkräftiger Saft gewonnen werden kann. Zur Prüfung des Umfanges, in welchem nach diesem Verfahren der Austritt der Gärungsenzyme aus den Zellen stattfindet, wurden 270 g Hefe, in Stangen von 1,5 cm Durchmesser geformt und, in Pergamentpapier eingewickelt, 15 Minuten lang in flüssige Luft versenkt. Beim Auftauen entstand ein Brei, welcher beim Zentrifugieren 90 ccm Saft lieferte. Die Gärprobe, in gewöhnlicher Weise angestellt, ergab fast keine Selbstgärung und auf Rohrzuckerzusatz deutliche, aber immerhin nur schwache Gärwirkung (s. Tabelle VII).

Tabelle VII.

Saft aus Hefe durch Behandlung mit flüssiger Luft.
Je 20 ccm Saft + 0,3 g Toluol mit bzw. ohne 8 g Rohrzucker; 22°.

Versuchstag	Hefeart		Ausbeute: ccm Saft	Kohlendioxyd in g nach Tagen	
				1	Endzahl n. 4 Tag.
14. II. 17	Würzburg- Unterhefe	270 g Hefe in flüssige Luft gebracht, dann zentrifugiert	90	0,08	0,11
				0,09	0,13
		Saft wie oben, aber ohne Zuckerzus. (Selbstgärung)		0,01	0,01
				0,00	0,00

Da die mikroskopische Prüfung des abzentrifugierten Rückstandes nur unverletzte Zellmembranen erkennen ließ, war also durch die starke Abkühlung und das Wiederauftauen eine kräftige Plasmolyse eingetreten, die jedenfalls einen Teil der Gärungsenzyme durch die Plasmahaut und die Zellmembran hindurchgepreßt hatte.

¹⁾ Scient. Proc. R. Dublin Soc. 14 (N. S.) Nr. 1, 1913. Zitiert nach: v. Euler und Lindner, Chemie der Hefe, Leipzig 1915, 87.

Wirkung von Toluol auf die Gärungsvorgänge.

Von

Eduard Buchner und Siegfried Skraup.

(Aus dem Chemischen Institut der Universität Würzburg.)

(Eingegangen am 29. März 1917.)

Zusatz von Toluol schädigt die Gärung durch lebende Hefe in hohem Grade¹⁾. Im Gegensatz dazu wird die Gärwirkung des Hefepreßsaftes durch eine das Wachstum von Mikroorganismen verhindernde Menge von Toluol nur gerade noch nachweisbar geschädigt und auch durch größere Zusätze von 4 bis 5⁰/₀ nur unwesentlich (im Maximum um 8 bis 12⁰/₀) herabgedrückt²⁾. Diese geringe Hemmung scheint uns durch Annahme einer Änderung der Oberflächenspannung der Gärungsenzyme, ihres Quellungszustandes oder möglicherweise des Dispersitätsgrades genügend erklärt. Bei großen Mengen von Toluol, das in Form eines Tropfens auf der Flüssigkeit schwimmt, kann dazu vielleicht noch die Entziehung von in Toluol löslichen, für die Entfaltung der vollen Gärwirkung nützlichen Stoffe aus dem Preßsaft in Frage kommen.

Nun haben H. von Euler und S. Kullberg³⁾ vor einiger Zeit Versuche veröffentlicht, wonach Toluol die Wirkung vollkommen steriler Trockenhefe stark hemmen soll. Es lag aber

¹⁾ Vgl. z. B. E. u. H. Buchner und M. Hahn, die Zymasegärung 1903, 180. Die vermutlichen Ursachen dafür sind in der vorhergehenden Abhandlung, im Abschnitt: „Folgerungen für die Natur der Zymase“, ausführlich besprochen.

²⁾ Zymasegärung 1903, 177, 179.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 92, 1911. Zu den Vorstellungen von O. Warburg (vgl. z. B. Über die Wirkung der Struktur auf chemische Vorgänge in Zellen, Jena, G. Fischer 1913, 16) beabsichtigen wir uns erst in einer späteren Abhandlung zu äußern.

schon damals ein nicht veröffentlichter Versuch über Toluolwirkung auf die Gärung durch Acetondauerhefe vor¹⁾; einen weiteren haben wir jetzt durchgeführt; beide sind in Tabelle I vereint. Die Dauerhefe, die nach früheren Feststellungen praktisch steril ist, wurde dabei mit Rohrzucker und Wasser versetzt und die Gärwirkung ohne Zusatz, sowie nach Zugabe von 1 bzw. 10% Toluol bei 22° bestimmt. Das Ergebnis war das erwartete, mit den Preßsaftversuchen völlig übereinstimmende; der Zusatz von wenig Toluol ergab nur eine schwach hemmende Wirkung, die durch Erhöhung des Zusatzes im einen Falle nicht, im andern nur wenig gesteigert wurde. Der Unterschied zwischen den Proben mit und ohne Antiseptikum wird zum Teil auch auf Entwicklung von Mikroorganismen in den Kölbchen ohne Toluolzusatz zurückzuführen sein.

Tabelle I.

Einwirkung von Toluol auf die Gärung durch
Acetondauerhefe.

Je 2 g Acetondauerhefe + 4 g Rohrzucker + 10 ccm Wasser; 22°.

Nr. des Versuchs	Versuchstag	Hefeart	Toluolzusatz ccm	Kohlendioxyd in g nach Tagen		
				1	3	Endzahl
1	26. VII. 1911	Würzburger Unterhefe	0	0,32 0,32	0,80 0,81	0,84 0,86
			0,2	0,30 0,30	0,70 0,70	0,75 0,75
			2,0	0,30 0,29	0,70 0,69	0,75 0,74
2	27. IX. 1916		0	0,18 0,18	0,46 0,45	0,63 0,63
			0,2	0,16 0,17	0,41 0,42	0,54 0,54
			2,0	0,14 0,15	0,36 0,38	0,49 0,51

Wie ist das abweichende Ergebnis der Versuche von v. Euler und Kullberg zu verstehen? Diese Forscher hatten mit 8%iger Glucoselösung und bei hohen Temperaturen, nämlich 30,6°, gearbeitet, ferner den unter diesen Umständen sehr rasch sich ab-

¹⁾ Die Ausführung desselben ist Herrn Dr. Ferdinand Reischle zu verdanken.

spielenden Gärungsvorgang nur während der ersten 8 Stunden verfolgt, während sich unsere Versuche bei 22° und 28°iger Rohrzuckerlösung über 4 bzw. 6 Tage erstreckten. Um unter ähnlichen Bedingungen, wie die genannten, arbeiten zu können, benützten wir nun den Schüttelthermostat von J. H. Walton¹⁾, der gestattet, den Gärungsvorgang kinetisch durch ständige Aufsammlung des Kohlendioxyds zu verfolgen, wovon auch schon A. von Lebedew²⁾ Gebrauch gemacht hat. Als Sperrflüssigkeit diente uns mit Kohlendioxyd gesättigtes Wasser³⁾.

Durch einen Vorversuch war festgestellt worden, daß die Gärung durch Lebedew-Hefe erst 4 bis 5 Stunden nach dem Einbringen der Kölbchen in den Thermostaten anfängt, regelmäßig zu werden (dies hängt wohl mit der verschiedenen Größe der Hefekrümel und deren ungleichmäßiger Durchtränkung mit der Zuckerlösung zusammen); von da ab blieb sie dann durch weitere 4 bis 5 Stunden hindurch in den 4 Parallelversuchen ganz gleichmäßig (Durchschnittsdifferenz der einzelnen Kölbchen bei Ablesungen je nach 20 Minuten 0,1 ccm). Daraufhin gelangten im ersten der in Tabelle II aufgeführten Versuche vom 22. I. 1917 entsprechend der Arbeitsweise von v. Euler und Kullberg je 1 g Lebedew-Hefe in 25 ccm 8°iger Glucoselösung (Traubenzucker „Kahlbaum“) ohne bzw. mit 2 ccm Toluol bei 31° zum Ansatz. Die ungewöhnlich hohe Temperatur ist für die Gärwirkung sehr schädlich. Um einen genauen Vergleich zu ermöglichen, mußten wir uns aber an die Versuchsbedingungen von v. Euler und Kullberg halten. Es zeigte sich auch, daß die Gärung schon am zweiten Tage beendet war, bis auf einige Kölbchen ohne Toluolzusatz, wo es sich wahrscheinlich um Wachstum von Mikroorganismen handelte. 4 bzw. 5 Stunden nach dem Einbringen der Kölbchen in den Thermostaten wurden dieselben mit der Meßbürette verbunden und mit den Ablesungen begonnen. Die große

¹⁾ Zeitschr. f. physikal. Chem. 47, 185, 1904; 60, 202, 1907.

²⁾ Diese Zeitschr. 10, 454, 1908.

³⁾ Wir gaben dieser aus dem Laboratorium G. Bredigs stammenden, sehr bewährten Versuchsanordnung den Vorzug vor der von A. Harden, J. Thompson und W. J. Young (Biochemical Journ. 5, 230, 1910) beschriebenen Apparatur, da sie die Anwendung von Dreiweghähnen und von Quecksilber entbehrlich macht.

Differenz zwischen den beiden Parallelkölbchen mit Toluolzusatz bei der Ablesung nach 60 und 80 Minuten beweist, daß um diese Zeit eine Gleichmäßigkeit der Gasentwicklung noch nicht erreicht war, und mit der Ablesung daher besser erst später begonnen wird.

Innerhalb der nächsten 100 Minuten wurde nun die Geschwindigkeit der Kohlendioxydentwicklung durch Toluolzusatz mindestens auf die Hälfte herabgesetzt.

Der zweite Versuch, vom 5. II. 1917, mit gleicher Hefe und auch sonst übereinstimmend ausgeführt, hatte genau den gleichen Verlauf; aus eben genanntem Grunde wurde hier vom genauen Verfolg der Gasentwicklung in der fünften Stunde nach Einsetzen in den Thermostaten und der entsprechenden Eintragung der Zahlen in die Tabelle abgesehen. Dagegen wurde am Ende der Versuche, nach 400 und 420 Minuten nochmals abgelesen; die so für die Zeit von 300 bis 400 Minuten für je 20 Minuten berechneten Durchschnittszahlen passen sich völlig den auch im übrigen Verlauf des Versuchs gefundenen Resultaten an, die also die Ergebnisse von v. Euler und Kullberg bestätigen.

Zur Erklärung der so auch von uns festgestellten vorübergehenden Schädigung der Gärung von Trockenhefe durch Toluol tauchte die Annahme auf, daß das letztere den Übergang des Trockenpräparates in einen für die Gärung optimalen Quellungs- und Durchlässigkeitszustand hindere; dafür mußte sich ein experimenteller Beweis durch Verwendung von Macerationsaft an Stelle der Trockenhefe führen lassen, da bei einem solchen die Durchlässigkeitsverhältnisse gar keine, der Quellungszustand der gelösten Stoffe sicher nur eine ganz geringe Rolle spielen konnten.

Aus derselben zu obigen Versuchen verwendeten Lebedew-Hefe wurde daher in üblicher Weise¹⁾ ein Auszug hergestellt, von dem je 25 ccm mit 2 g Glucose ohne bzw. mit Zusatz von 2 ccm Toluol in je 2 Parallelkölbchen zum Ansatz gelangten. Mit der Ablesung konnte bei diesen Versuchen schon eine Stunde nach dem Einbringen der Kölbchen in den Thermostaten begonnen werden.

¹⁾ Vgl. die vorhergehende Abhandlung (Die Abtrennung des Auszuges erfolgte hier durch Zentrifugieren).

Tabelle II.

Einfluß von Toluol auf die Gärwirkungen von Lebedew-Hefe
und von Macerationssaft aus solcher im Walton-Apparat.
Entwickeltes Kohlendioxyd in ccm innerhalb 20 Minuten.

Minuten nach Beginn der Ableseung	Aus 1 g Lebedew-Hefe + 25 ccm 8%iger Glucose- lösung; 31°				Aus 25 ccm Macerationssaft + 2 g Glucose; 31°			
	Versuch v. 22. I. 17		Versuch v. 5. II. 17		Versuch v. 7. II. 17		Versuch v. 9. II. 17	
	ohne Toluol	mit 2 ccm Toluol	ohne Toluol	mit 2 ccm Toluol	ohne Toluol	mit 2 ccm Toluol	ohne Toluol	mit 2 ccm Toluol
20	1,5	0,1	—	—	25,0	22,6	24,6	22,8
	1,5	1,1	—	—	28,0	23,3	25,6	23,2
40	1,5	0,2	—	—	21,7	18,4	24,6	19,7
	1,4	0,9	—	—	25,9	20,6	23,6	21,3
60	1,4	2,6	—	—	—	—	—	—
	1,4	0,8	—	—	—	—	—	—
80	1,6	3,0	1,7	2,1	21,8	16,0	22,9	17,6
	1,6	0,9	1,8	0,8	21,0	17,9	21,2	16,9
100	1,1	1,6	1,9	1,6	20,9	14,8	20,6	14,9
	0,9	0,7	1,8	0,9	19,4	16,2	19,7	16,7
120	1,4	1,1	1,3	1,0	—	—	—	—
	1,3	0,7	1,6	0,6	—	—	—	—
140	1,6	0,9	1,5	0,7	—	—	—	—
	1,7	0,7	1,7	0,7	—	—	—	—
160	1,4	0,6	1,4	0,6	—	—	—	—
	1,4	0,6	1,6	0,5	—	—	—	—
180	1,6	0,6	1,4	0,4	—	—	—	—
	1,7	0,8	1,6	0,5	—	—	—	—
200			1,6	0,4	—	—	—	—
			1,8	0,5	—	—	—	—
220			1,7	0,3	—	—	—	—
			1,7	0,3	—	—	—	—
240			1,4	0,1	—	—	—	—
			1,7	0,2	—	—	—	—
260			1,5	0,3	—	—	—	—
			1,6	0,3	—	—	—	—
280			1,4	0,0	3,3	7,0	4,0	9,1
			1,3	0,2	3,1	6,3	3,4	9,0
300			1,8	0,1	3,9	6,2	4,0	6,8
			1,7	0,2	3,6	5,9	3,4	5,9
320			—	—	3,7	4,3	4,2	5,4
			—	—	4,2	4,3	3,6	5,4

Tabelle II. [Fortsetzung.]

Einfluß von Toluol auf die Gärwirkungen von Lebedew-Hefe
und von Macerationssaft aus solcher im Walton-Apparat.

Entwickeltes Kohlendioxyd in ccm innerhalb 20 Minuten.

Minuten nach Beginn der Ablesung	Aus 1 g Lebedew-Hefe + 25 ccm 8%iger Glucose- lösung; 31°				Aus 25 ccm Macerationssaft + 2 g Glucose; 31°			
	Versuch v. 22. I. 17		Versuch v. 5. II. 17		Versuch v. 7. II. 17		Versuch v. 9. II. 17	
	ohne Toluol	mit 2 ccm Toluol	ohne Toluol	mit 2 ccm Toluol	ohne Toluol	mit 2 ccm Toluol	ohne Toluol	mit 2 ccm Toluol
340			—	—	3,3 4,2	3,2 3,8	4,5 4,2	4,4 3,9
360			—	—	4,5 5,1	3,7 3,7	4,3 3,6	2,5 3,0
380			—	—	4,3 5,0	3,2 3,1	4,5 2,2	2,5 2,8
400			0,7 ¹⁾ 0,5)	0,0 ¹⁾ 0,2 ¹⁾	1,8 3,2	2,4 2,2	4,7 4,3	2,7 2,9
420			0,6 0,4	0,0 0,0	4,6 5,5	3,0 3,2	4,9 4,4	3,2 3,0
440					2,8 4,1	2,4 2,5	4,9 4,7	2,6 3,0
460					4,3 4,5	3,7 2,6	4,8 3,9	3,0 2,4

Die Verlangsamung durch Toluol ist im Anfang gering (10 bis 20%), im Gegensatz zu den Versuchen mit fester Trockenhefe, wird nach 320 bis 340 Minuten unmerklich und schwankt dann, wie auch die Werte ohne Toluolzusatz. In der Zeit bis 300 Minuten ist die Geschwindigkeit mit Toluol sogar größer als ohne, wahrscheinlich als Einholen des durch die etwas herabgesetzte Anfangsgeschwindigkeit bedingten Zurückbleibens zu deuten. Der zweite Versuch vom 9. II. 1917 ergab mit dem ersten völlig übereinstimmende Resultate.

Es sind damit die Versuche von v. Euler und Kullberg zwar bestätigt, aber ihrer allgemeinen Bedeutung entkleidet, denn die Schädigung durch Toluol ist eine zeitlich vorübergehende.

¹⁾ Durchschnitt aus den Werten von 300 bis 400 Minuten.

Bei den Versuchen dieser und der vorausgegangenen Abhandlung konnten wir wiederholt nach Beendigung der Gärung eine Absorption des Kohlendioxyds durch den vergorenen Rückstand beobachten, was besonders bei den Versuchen im Walton-Apparat deutlich wurde¹⁾.

¹⁾ Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Angaben von A. von Lebedew, diese Zeitschr. 10, 454, 1908.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

XXXI. Mitteilung.

Über das Zusammenwirken von Milz, Schilddrüse und Knochenmark.

Von

Marcel Dubois.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 1. April 1917.)

Mit 16 Figuren im Text.

Einleitung.

Eine Reihe vorausgegangener Arbeiten aus dem Berner Institute hatten gezeigt, daß die Milz ein Organ des Eisenstoffwechsels sei; ich erinnere an die Arbeiten von Asher und seinen Mitarbeitern Großenbacher, Zimmermann und Vogel, sowie an die Bestätigung der neuen Lehre, einmal durch die Arbeiten von Bayer in der Garréschen Klinik am Menschen, andererseits durch die Untersuchungen von M. B. Schmidt vom Standpunkte der Morphologie. Es durften aber trotz der neuen und gesicherten Erkenntnis ältere Befunde nicht außer acht gelassen werden, und auch war das Augenmerk auf neue Beziehungen zu richten. In Hinblick hierauf haben sowohl Vogel wie Sollberger in Ashers Laboratorium die Beziehungen der Milz zum Entstehen und Vergehen von Blutkörperchen und Blutfarbstoff von neuem in Angriff genommen, wobei sie naturgemäß von der Grundlage ausgingen, daß die Milz ein Organ des Eisenstoffwechsels sei, aber auch unabhängig von dieser Lehre die Stellung der Milz im Haushalte des Blutes näher zu präzisieren versuchten. Ein wesentlicher Schritt weiter wurde durch die

Arbeit von Ebnöther getan, der zeigen konnte, daß ein Zusammenwirken der Milz mit der Leber stattfindet, indem sowohl das hämolytische wie das hämoglobin-zerstörende Vermögen der Leber durch die Milz wesentlich verstärkt wird. Hier war ein sinnfälliges Beispiel dafür gefunden, daß die Milz, wie Professor Asher es ausgedrückt hat, durch den Besitz von nur mittelbaren Funktionen ausgezeichnet ist, d. h. daß sie nicht eine selbständige schon allein genommen vollwertige Funktion vollzieht, vielmehr nur mittelbar wirkt, indem sie in das Geschehen einer anderen für sich allein existenzfähigen Funktion eingreift. Diese Tatsache hat ja auch die Erforschung der Milzfunktion überhaupt so sehr erschwert, weil erst erkannt werden mußte, in welche anderen Funktionen die Milz eingreift. In dieser Beziehung verhält sich die Milz ganz analog mit der Schilddrüse, für welche die gleichen Betrachtungen gelten. Will man also den Anteil, den die Milz am Entstehen und Vergehen von Blutkörperchen nimmt, weiter verfolgen, so ist es geraten, das etwaige Zusammenwirken der Milz mit anderen Organen ins Auge zu fassen, welche in Beziehung zum Haushalte des Blutes gesetzt werden. Sobald man aber an diese Aufgabe herantritt, wird man sich nicht auf das Studium der roten Blutkörperchen beschränken, sondern man wird auch die weißen Blutkörperchen mit in den Bereich der Untersuchung ziehen. Dies um so mehr, als unser augenblickliches Wissen um die weißen Blutkörperchen uns jetzt schon einen Rückschluß auf das Verhalten einzelner Organe oder Organsysteme gestattet, für die wir Anhaltspunkte besitzen, daß die Beziehungen zwischen ihnen und der Milz experimentell untersucht werden sollten.

Von solchen Gesichtspunkten ausgehend, wurde auch die vorliegende Arbeit unternommen.

Was nun die Beziehungen der Milz zur Blutbildung betrifft, so wissen wir, daß dieses Organ beim Erwachsenen unter normalen Verhältnissen nie rote Blutkörperchen und keine polymorphkernigen Leukocyten produziert, wohl aber Lymphocyten. Die Untersuchungen von Klemperer und Hirschfeld ergeben nach der Milzexstirpation eine starke Reizung des Knochenmarkes. Der Entkernungsvorgang der roten Blutkörperchen ist gestört, im Kreislaufe treten kernhaltige Formen

auf, was nicht nur eine Störung der Hämolyse (Ebnöther), sondern einen direkten Reiz bedeutet vielleicht auf dem Wege eines Hormons. Diese Ansicht wird unterstützt durch die klinische Erfahrung einer auffallenden Besserung der perniziösen Anämie durch Milzexstirpation.

Die Splenektomie hat auch Einfluß auf das weiße Blutbild, und Untersuchungen von Regling und Klunker zeigen nach der Operation eine Abnahme der Lymphocyten, die sich aber mit der Zeit wieder ausgleicht und sogar in eine dauernde Lymphocytose übergeht. Endlich ertragen nach Pugliese milzlose Tiere Blutgifte besser als unversehrte.

Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, daß der Milz eine regulierende, vielleicht hemmende Wirkung auf das blutbildende Knochenmark zukommt.

Vogel erwähnt in seiner Arbeit nebenbei die Beobachtung, daß bei seinem Kontrolltiere Diarrhöen aufgetreten seien, von denen unter gleichen Bedingungen beim milzlosen Tiere nichts zu konstatieren war. Er schließt daraus auf eine größere Widerstandskraft nach der Milzexstirpation. Ich erwähne hier diese Tatsache, weil ich im Verlaufe meiner Versuchsreihen einmal Gelegenheit hatte, ähnliche Erscheinungen zu beobachten. Normalerweise bindet das Eisen die die Peristaltik anregenden Schwefelalkalien des Darminhaltes. Wird nun in der Nahrung die Eisenzufuhr herabgesetzt, so tritt naturgemäß Diarrhöe ein. Vogel ernährte seine Tiere eisenarm. Da nun aber die Milz ein Organ des Eisenstoffwechsels ist, d. h. da der Organismus ohne Milz mehr Eisen ausscheidet als sonst, könnte dieses nach dem oben beschriebenen Mechanismus die Diarrhöen verhüten haben. Das nur nebenbei.

Wie von der Milz, so sind auch von der Schilddrüse Beziehungen zur Blutbildung gesucht worden. So hat namentlich Mansfeld in Budapest nach dieser Richtung hin gearbeitet. Gegenüber der gesteigerten Blutbildung im Höhenklima, bei intaktem Tiere, beobachtete der Autor keine Spur derselben an schilddrüsenlosen Tieren. Der Sauerstoffmangel wirkt also in dieser Beziehung bei schilddrüsenlosen Tieren nicht. Er greift auf dem Wege der Schilddrüse an. Damit in Einklang zu bringen ist auch die Tatsache, daß die Regeneration von Anämien bei schilddrüsenlosen Tieren eine schlechtere ist als

bei unversehrten. Es ergibt sich, daß die Schilddrüse anregend auf die Blutbildung wirkt, was durch die histologischen Untersuchungen Ollinos unterstützt wird, welcher fand, daß Schilddrüsenextrakte eine Reizung des Knochenmarkes zur Folge haben. Andererseits beobachtet Kocher bei thyreopriven Menschen eine Abnahme des Hämoglobingehaltes.

Die Probleme lagen also soweit im Fluß, daß der Versuch, den inneren Zusammenhang derselben genauer zu bearbeiten, zweckmäßig erschien. Gern folgte ich deshalb einer Anregung Professor Ashers in diesem Sinne. Da es sich auch um die Frage einer genaueren Methodik handelte, lag es nahe, vor allem das zu verwenden, was uns die moderne Hämatologie zur Verfügung stellt.

Als Virchow seinerzeit die Leukämie entdeckte, eröffnete sich der Medizin ein neuer Zweig, aus jener Entdeckung entwickelte sich die Hämatologie. Durch die klassischen Arbeiten Ehrlichs lernte man die einzelnen Blutelemente genau differenzieren. Diese Methode ist sowohl über- als unterschätzt worden; überschätzt, weil man von ihr mehr verlangte, als sie überhaupt zu liefern imstande war, und unterschätzt, weil sie nicht immer genügend und mit dem nötigen Verständnis verwendet wurde. Im richtigen Lichte betrachtet, erlaubt uns die Kenntnis der Zusammensetzung des Blutes aus verschiedenen Zellen, wichtige Anhaltspunkte zu gewinnen für die Beurteilung verschiedener Zustände und verschiedener Verhältnisse. So ist heute die Blutuntersuchung eine wichtige Untersuchungsmethode geworden. Um vollständig zu sein, ist von ihr zu verlangen: die Bestimmung des Hämoglobingehaltes, die Zählung der roten und weißen Blutkörperchen, die Untersuchung eines frischen Blutpräparates und endlich die Untersuchung eines gefärbten Präparates unter Berücksichtigung sowohl der roten als auch der weißen Blutkörperchen. Im intrauterinen Leben entstehen rote Blutelemente zunächst aus den primitiven Gefäßanlagen, dann funktionieren Leber und Milz als hämatopoetische Apparate. Nach der Geburt treten diese zurück, die Bildung der Blutkörperchen spielt sich dann normalerweise im roten Mark der platten Knochen und Wirbel ab. Es sei aber nebenbei erwähnt, daß die erythroblastische Tätigkeit unter abnormen Verhältnissen auf das gelbe Mark der langen Röhren-

knochen, ja sogar auf die ursprünglichen Bildungsstätten übergreift.

Über die Bildung der weißen Blutkörperchen gehen die Ansichten der Forscher in manchen Punkten auseinander, doch geht die Meinung der meisten dahin, daß die polymorphkernigen Leukocyten im Knochenmark aus den einkernigen Myelocyten hervorgehen, daß die einkernigen Lymphocyten dagegen wesentlich den Lymphblasten der Milz und der Lymphdrüsen entspringen. Die Kenntnis der Funktion der einzelnen Blutelemente ist leider noch eine mangelhafte. Trotzdem besitzt aber heutzutage die Untersuchung des Blutbildes nicht nur mehr morphologischen Wert, sondern sie gibt uns Aufschluß über die Funktion der blutbildenden Organe unter den verschiedenen Bedingungen. An Hand eines Blutpräparates läßt sich nach der Meinung vieler Autoren von Hypo-, Hyper- und Dysfunktion sprechen. Wir kommen in die Lage, die Leistungsfähigkeit der Organe zu beurteilen. Von diesen Anschauungen ausgehend, wurden die nachfolgenden Experimente unternommen.

Versuchsanordnungen, Methodik.

Für meine Experimente wählte ich das Kaninchen, da sich bei diesem die Schilddrüse am besten unter Schonung der Nebenschilddrüsen entfernen läßt und infolgedessen nicht wie beim Hund Tetaniegefahr besteht. Es wurden möglichst gleich alte und gleich große Tiere gewählt, diese unter den gleichen Bedingungen gehalten. Eine besondere Diät brauchte nicht beobachtet zu werden, die Tiere wurden infolgedessen eisenreich ernährt. Da bekannt ist, daß sich das weiße Blutbild nach der Nahrungsaufnahme ändert, erfolgte die Blutentnahme möglichst zu gleichen Zeiten, um derartige Fehler tunlichst auszuschließen. Zu jedem neuen Eingriff wurden frische Tiere benutzt.

Zur Hämoglobinbestimmung diente das Hämometer nach Prof. Sahli, zur Zählung von Erythro- und Leukocyten der Hayem-Sahlsche Apparat. Als Verdünnungsflüssigkeit diente Hayemsche Lösung für die roten, eine Lösung von Essigsäure und Methylenblau für die weißen Blutkörperchen. Es ist nicht nötig, hier des nähern auf diese Verhältnisse einzugehen. Ihre genaue Darstellung findet sich in dem Sahlischen Lehrbuch

der klinischen Untersuchungsmethoden, oder nach diesem in der schon oben erwähnten Arbeit Vogels.

Das histologische Blutbild wurde an Ausstrichpräparaten auf Objektträgern untersucht. Ein Blutstropfen kam auf das gut gereinigte Glas und wurde mit dem Rande eines Deckgläschens möglichst gleichmäßig verstrichen. Ich wählte, um die Resultate sicherer zu gestalten, verschiedene Färbungsmethoden, so nach Ehrlich (Triacid), nach Jenner-May, nach Giemsa und nach Romanowsky-Giemsa. Letztere bewährte sich mit der Zeit besonders, und die Erfahrung lehrte, daß sie sich in folgender Modifikation für das Kaninchenblut eignete. Die lufttrockenen Präparate wurden während 3 Minuten in Methylalkohol fixiert. Im Verhältnisse von 1 Tropfen Farbe zu 1 ccm dest. Wassers wurde die Farblösung jedesmal frisch bereitet. Die fixierten und getrockneten Präparate kamen während 15 bis 20 Minuten mit der Farbe in Berührung, nachher wurden sie in Brunnenwasser kurz abgespült, dann getrocknet und vermittelt eines Immersionssystems untersucht. Immer wurden 300 bis 350 Leukocyten durchgezählt. Größere, gelegentlich ausgeführte Zählungen erwiesen diese Zahl als genügend, um Resultate innerhalb geringer Fehlergrenzen zu erhalten.

Das Blut entnahm ich den Ohrvenen, nachdem ich vorher das Ohr sorgfältig mit Alkohol und Äther gereinigt hatte. Die Eröffnung der Venen erfolgte durch schräges Einstechen mit einer sterilen Stecknadel; dann wurde das hervorquellende Blut ohne Druck aufgefangen. Mit dieser einfachen Methode ließen sich bessere Resultate erzielen, als mit den üblichen Schnepfern. Die Gefäßverletzung konnte so auf ein Minimum beschränkt bleiben, die kleine Wunde schloß sich jeweilen sehr rasch und spurlos. Das war für fortgesetzte Untersuchungen sehr wünschenswert im Interesse einer möglichst geringen Trübung des Blutbildes.

Vor allem galt es, an den Tieren Voruntersuchungen anzustellen, um von den physiologischen Schwankungen Kenntnis zu nehmen und um vor allem das weiße Blutbild des Kaninchens, das ich in keiner Literaturangabe fand, festzuhalten. Während der ganzen Dauer der Versuche wurden selbstverständlich Kontrolltiere unter den gleichen Bedingungen beobachtet.

Die Operationen.

Zu den Untersuchungen wurden mehrere Tiere operiert, um möglichst sichere Resultate zu erhalten. Eine halbe Stunde vor der Operation bekamen die Kaninchen 0,02 Morphium muriat. subcutan und bedurften nachher nur weniger Tropfen Äthers, um in vollständiger und ruhiger Narkose zu liegen. Ich habe auch einige Tiere vermittelt Urethan narkotisiert, die Anästhesie war dabei auch immer eine sehr gute, doch erholten sich nachher die Tiere nur schwer von dem Eingriffe. Das Urethan scheint sich also eher für Eingriffe zu bewähren, die vom Tiere nicht überlebt zu werden brauchen.

Selbstverständlich erfolgten die Operationen unter streng aseptischen Kautelen, wobei auch die Desinfektion des Kaninchenfells in gehöriger Weise erfolgte, galt es doch, auch die geringste Infektion auszuschließen.

Die Splenektomie: Kurzer Schnitt in der Linea alba, vom Processus xiphoideus sterni an nach abwärts. Eröffnung des Peritoneums. Eingehen auf die Milz an der großen Kurvatur des Magens vorbei. Sorgfältiges Fassen der Milzgefäße mit Arterienklemmen. Unterbindungen. Exstirpation des Organes. Reposition der prolabierten Eingeweide. Schließen der Bauchdecken durch Knopfnähte. Blutverlust fast Null.

Die Thyreoidektomie: Mittlerer Halsschnitt. Jeder Lappen wird für sich von den Gefäßen abgebunden und exstirpiert. Die beiden äußeren Glandulae parathyreoideae, sowie die Nervi recurrentes werden dabei sorgfältig geschont. Schluß der Wunde durch Knopfnähte. Keinerlei Blutung.

Wie aus dem folgenden zu ersehen ist, wurden auch beide Organe am gleichen Tiere exstirpiert. Die Operationen wurden in einer Sitzung in der oben angegebenen Weise ausgeführt. Es wurde auch versucht, bei der Splenektomie den Schnitt auf der linken Seite, direkt unter der Milz auszuführen. Die oben beschriebene Methode von der Linea alba aus ergibt aber die besseren Heilungsergebnisse und bietet nicht wesentlich größere Schwierigkeiten.

Wirkungen der Operationen auf das Blutbild.

Es mögen hier zunächst einige Protokolle folgen, die dar- tun, daß während 3 Monaten die Werte beim Kontrolltiere sowohl für das quantitative als auch für das relative Blutbild ziemlich konstant blieben, so daß die Veränderungen, die sich bei den verschiedenen operierten Tieren darboten, offenbar auf den Eingriff zurückzuführen waren.

Tabelle I.
Kontrolltier.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
13. Nov. 15	76	4600000	4800
15. "	78	4890000	4950
17. "	76	4700000	4860
26. "	74	4953000	5100
1. Dez.	76	4831000	4980
15. "	73	4769000	4720
1. Jan. 16	76	4925000	5250
6. "	74	5020000	4980
17. "	78	4988000	5100
21. "	75	4894000	4460
2. Febr.	77	5051000	4980

Die Schwankungen, die hier zutage treten, sind so geringe, daß sie wohl auf Rechnung der Versuchsfehler und auf die zweifelsohne schon physiologischerweise vorkommenden Variationen geschrieben werden können.

Es folgt nun die Untersuchung des histologischen Blutbildes:

Tabelle II.
Kontrolltier.

Datum	Lymphocyten	Poly- morphk. Leukocyt.	Übergangs- formen	Gr. Mono- nukleäre	Basophile
13. Nov. 15	35,1	55,3	4,2	1,7	3,7
15. "	36,5	54,0	4,5	2,0	3,0
17. "	37,1	52,1	4,7	2,3	3,8
26. "	35,2	53,9	5,6	2,2	3,1
1. Dez.	36,8	53,2	5,5	2,3	2,2
15. "	35,6	55,2	4,8	1,5	2,9
1. Jan. 16	36,8	53,2	5,5	2,3	2,2
6. "	35,1	56,4	4,0	1,7	1,7
17. "	35,1	54,8	4,4	1,9	1,9
21. "	36,0	55,1	4,6	2,1	2,1
2. Febr.	36,1	54,1	4,0	2,0	2,0

Die Reihe weist also auch hier eine ziemliche Konstanz auf. Welches war nun die Wirkung der Entmilzung auf diese Verhältnisse?

Tabelle III.
Versuchstier 1.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
17. Nov. 15	65	4674 000	4725
19. "	63	4706 000	4460
1. Dez.	66	4612 000	4980
1. Dezember: Milzexstirpation.			
7. Dez.	71	4988 000	5250
13. "	69	5051 000	4725
18. "	68	4925 000	4980
25. "	70	4957 000	5512
29. "	67	4643 000	4700
7. Jan. 16	66	4831 000	4900

Tabelle IV.
Versuchstier 1.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
17. Nov. 15	39,3	49,3	6,2	4,5	4,0
19. "	37,1	51,1	4,7	2,3	4,8
1. Dez.	38,5	51,7	4,9	1,5	3,3
1. Dezember: Milzexstirpation.					
7. Dez.	32,3	54,2	7,3	3,5	2,7
13. "	35,2	52,3	6,3	3,0	3,2
18. "	37,3	51,5	5,2	2,1	3,9
25. "	51,8	35,5	6,6	2,9	3,3
29. "	53,3	37,6	5,1	1,8	2,2
7. Jan. 16	51,9	38,0	5,0	1,7	3,4

Es sei noch angeführt, daß ein 3. Tier splenektomiert wurde, das aber 2 Tage nach der Operation zugrunde ging. Soweit die Untersuchungen dabei angestellt werden konnten, stimmen sie mit den beiden angeführten überein.

Aus den Protokollen ergibt sich einmal, daß kurz nach der Operation sowohl Hämoglobinwert, als auch Zahl der Erythrocyten in geringem Maße anstiegen, um dann einige Tage später zur Norm zurückzukehren und sich dabei zu halten. Diese Befunde stimmen mit denjenigen Sollbergers und anderer überein; die Zahl der Leukocyten erleidet keine wesentliche Erhöhung.

Tabelle V.
Versuchstier 2.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
3. Febr. 16	73	4643000	5240
7. "	71	4769000	5170
9. "	75	4706000	4900
11. "	74	4674000	4825
14. "	74	4894000	4980
15. Februar: 16. Entmilzung.			
20. "	76	4988000	5100
24. "	79	5114000	4900
26. "	81	5459000	5512
29. "	78	5020000	5200
5. März	75	4863000	4980
10. "	77	4925000	4725
13. "	73	4831000	4462
20. "	72	4674000	4980
25. "	74	4831000	4725
30. "	72	4957000	5100

Tabelle VI.
Versuchstier 2.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leucocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
3. Febr.	38,8	54,0	2,4	1,5	3,3
7. "	38,4	53,6	3,1	1,4	3,5
9. "	39,5	50,2	5,1	1,6	3,0
11. "	38,2	53,3	4,4	1,0	3,1
14. "	38,8	50,2	5,1	2,1	3,8
15. Februar: Entmilzung.					
20. "	23,7	57,7	4,6	1,2	2,8
24. "	24,4	69,2	3,3	1,3	1,8
26. "	30,5	62,1	3,4	1,6	2,4
29. "	33,3	57,7	4,8	1,6	2,6
5. März	34,8	60,0	2,1	2,0	2,1
10. "	38,4	55,2	2,8	1,2	2,4
13. "	49,4	40,6	4,7	2,4	2,9
20. "	54,5	37,1	4,1	2,0	2,3
25. "	52,8	38,8	3,9	2,1	2,4
30. "	54,0	37,8	5,0	1,1	2,1

Die histologischen Untersuchungen der Erythrocyten ergaben keine wesentlichen Formveränderungen derselben. Während aber vor der Operation und beim Kontrolltiere kernhaltige rote Blutkörperchen nicht zu beobachten waren, konnten derartige Formen nachher in ziemlicher Zahl gefunden werden,

und zwar trugen sie den Charakter von Normoblasten, d. h. ihre Größe entsprach der der normalen Erythrocyten.

Es wurden ferner in den Präparaten eine Reihe von Formen des Jollyschen Typus gefunden. Man versteht darunter rote Blutkörperchen mit Kernresten, die in die gleiche Kategorie wie die Normoblasten gehören. Wie diese stellen sie ungeriffelte Formen dar. Das beweist, daß der Entkernungsvorgang, der sich physiologischerweise im Knochenmark abspielt, durch die Milzexstirpation gestört wird. Das kann nur auf einer Reizung des erythroblastischen Systems beruhen. Bei eigentlichen Schädigungen des Knochenmarkes treten im Blute Megaloblasten, große, kernhaltige Formen auf, und diese waren hier nicht zu beobachten.

Die Milzexstirpation steigert die Tätigkeit des Knochenmarkes in einer Weise, daß nicht nur Hämoglobingehalt und Zahl der roten Blutkörperchen wachsen (das konnte ja nach der Arbeit Ebnöthers auch nur auf herabgesetzter Hämolyse beruhen), sondern, daß ungeriffelte Formen an das zirkulierende Blut abgegeben werden. Der Reiz ist so stark, daß das Knochenmark in seiner Aufgabe, die Erythrocyten zu entkernen, nicht nachkommt.

Bevor auf die Betrachtung der Operationsfolgen auf das weiße Blutbild eingegangen werde, sei noch eine graphische Darstellung dieser Verhältnisse vorausgeschickt. Darin sind die relativen Werte der Tabelle VI umgerechnet in die absoluten Zahlen von Tabelle V. Die Höhe der Kurve gibt also die Zahl der betreffenden weißen Blutkörperchen in 1 ccm an.

Die Kurven zeigen uns, daß nach der Operation eine relative Leukocytose, mit gleichzeitiger relativer Lymphopenie einsetzt. Der Zustand hält sich aber nicht lange, und bald tritt eine andauernde Lymphocytose ein. Man kann diese Erscheinung zunächst als den Ausdruck einer geschwächten Lymphopoese auffassen. Diese Annahme ist sehr einleuchtend, da bekannt ist, daß die Milz normalerweise an der Produktion von Lymphocyten beteiligt ist. So empfindlich aber die Milzexstirpation das lymphatische System stört, so leicht scheint sich dieses auch wieder zu regenerieren. In dieser Erholungszeit verrät es eine Überproduktion, als deren Zeichen wir die spätere anhaltende Lymphocytose betrachten können. Auch wieder

ein Beispiel dafür, wie stark das Bild der Milzausfallserscheinungen durch kompensatorische Vorgänge verdeckt wird.

Hier findet sogar dauernde Überkompensation statt. Diese Tatsache steht nun allerdings nicht für sich allein da. Wenn wir die Erfahrungen der menschlichen Pathologie zu Hilfe ziehen, wenn wir postinfektiöse und posttoxische Blutveränderungen betrachten, so sehen wir das gleiche Phänomen, diejenige Zellart nämlich, die im Verlaufe der Affektion am meisten zu leiden hatte und vermindert wurde, tritt in der Erholungszeit besonders vermehrt auf. Bei dieser Deutung bleiben allerdings noch zwei Möglichkeiten offen, nämlich erstens

Tabelle VII.

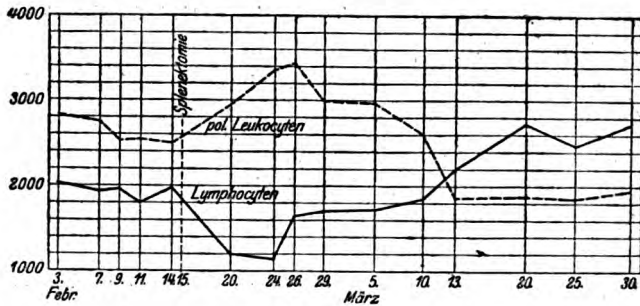


Fig. 1.

die Annahme, daß eine Leukocytenart kompensatorisch für die andere eintreten kann, solange diese andere in abnorm geringer Zahl vorhanden ist. Doch erscheint diese Ansicht nach den bisherigen Kenntnissen über die Funktionen der Leukocyten nicht wahrscheinlich. Der lymphatische und der myeloische Apparat stellen zwei getrennte Systeme dar, die z. B. getrennt erkranken können.

In zweiter Linie ließe sich gegen die oben entwickelte Anschauung das Argument ins Feld führen, daß die Veränderungen im Blutbilde auf einer verschiedenen Verteilung der weißen Zellen im Organismus beruhen. Nägeli tritt dieser Anschauung über die Lymphocytosen im allgemeinen entgegen, indem er eine vermehrte Tätigkeit der Bildungsstätten auf das bestimmteste befürwortet. Was nun für die Lymphocytosen im allgemeinen gilt, wird sich auch hier anwenden lassen.

Es bleibt uns noch übrig, die Erscheinungen und Veränderungen an den Elementen des myeloischen Systems zu deuten. Ein Blick auf die beigegebene Kurve zeigt uns nach der Operation ein auffallendes Steigen der Knochenmarkselemente, und zwar fällt der Gipfel der Kurve mit dem maximalen Hämoglobinwert zusammen. Diese Tatsache tritt auch beim ersten Versuchstier deutlich zutage. Die Kurve fällt dann wieder ab, um beim ersten Tiere nach 18, beim zweiten nach 25 Tagen die Norm zu passieren. Der Sturz dauert aber an, der Lymphocytose, die nun eintritt, macht eine relative Leukopenie Platz. Es ist sehr naheliegend, aus diesen Ergebnissen auch hier eine anfängliche Reizung des Knochenmarkes anzunehmen, wie es für das erythroblastische System vorher gemacht worden ist. Doch ist gerade hier in der Deutung der Befunde besondere Vorsicht geboten, wissen wir doch, mit welcher wandelbaren Verhältnissen wir es bei den Leukocyten zu tun haben. Man wird einwenden können, die Operation und die Wundheilung, wenn auch aseptisch verlaufend, möchten hier an der Blutbildveränderung schuld sein. Es zeigte sich aber in der Folge, wie aus den späteren Protokollen zu entnehmen sein wird, daß die Wegnahme der Schilddrüse keine derartige Reaktion zur Folge hatte.

Bei Leucocytosen findet man im Blute neben reifen polymorphkernigen Leukocyten häufig auch deren unreife Vorstufen, die Myelocyten. Bei Infektionskrankheiten z. B. ergibt das Maß, in dem solche unreife Formen auftreten, einen Anhaltspunkt für den Grad der Inanspruchnahme des Knochenmarkes. Arneth hat nun versucht, von derartigen Gesichtspunkten ausgehend, diese Leukocyten weiter zu differenzieren nach der Zahl der Kerne, da einkernige Formen junge Individuen darstellen, mehrkernige dagegen ältere. Das ist auch bei verschiedenen Infektionskrankheiten getan worden. Diese Befunde legten es nahe, auch bei den vorliegenden Versuchen das Arnethsche Blutbild zu untersuchen, um in der Deutung der Befunde nach der Milzexstirpation einen Schritt weiter zu kommen.

Diese Art der Untersuchung ergab folgende Resultate:

Tabelle VIII.
Versuchstier 1.

Datum	Myelocyten	Form. m. wenig eingebucht. Kern	Form. m. tief eingebucht. Kern	2kernige Formen	3kernige Formen	4kernige Formen
17. Nov.	0	2	13	43	27	15
1. Dez.	0	1	19	49	21	10
1. Dezember: Milzexstirpation.						
7. Dez.	5	7	28	53	6	1
18. "	3	8	21	57	10	3

Tabelle IXa.
Versuchstier 2.

Datum	Myelocyten	Form. m. wenig eingebucht. Kern	Form. m. tief eingebucht. Kern	2kernige Formen	3kernige Formen	4kernige Formen
9. Febr.	1	4	5	45	42	3
14. "	0	1	7	41	35	16
15. Februar: Milzexstirpation.						
20. Febr.	8	7	35	23	21	3
29. "	7	15	26	32	15	5

Beide Protokolle ergeben übereinstimmend, daß durch die Operation eine deutliche Verschiebung des Arnetschen Blutbildes nach links eintritt. Es treten im Blute jüngere Formen auf, als sie da normalerweise vorzukommen pflegen. Die Milzexstirpation scheint also auf die Bildungsstätten der weißen Knochenmarkselemente eine ähnliche Wirkung zu haben wie auf die der roten. Der Milz kommt offenbar physiologischerweise ein hemmender Einfluß auf das Knochenmark zu.

Tabelle IXb.
Versuchstier 3.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
18. Nov.	69	4518000	4725
20. "	68	4392000	4980
21. November: Entfernung der Schilddrüse.			
26. Nov.	65	4110000	4460
1. Dez.	67	4016000	4900
15. "	66	4204000	4725

Wie verändert sich nun das Blutbild nach der Exstirpation der Schilddrüse?

Tabelle X.

Versuchstier 3.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
18. Nov.	40,3	51,2	4,2	1,9	2,4
20. "	39,1	53,2	3,5	2,2	2,0
21. November: Entfernung der Schilddrüse.					
26. Nov.	46,8	45,5	2,9	1,8	3,0
1. Dez.	50,7	44,1	2,5	2,0	2,7
15. "	53,6	42,8	3,2	1,5	0,9

Tabelle XI.

Versuchstier 4.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
17. Nov.	74	4760000	4900
29. "	72	4799000	5200
1. Dez.	70	4841000	5350
6. "	73	4950000	4675
7. Dezember: Entfernung der Schilddrüse.			
12. Dez.	74	4318000	4725
17. "	70	4340000	4860
29. "	70	4100000	5100
6. Jan.	72	4460000	4980
19. "	75	4500000	4820

Tabelle XII.

Versuchstier 4.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
17. Nov.	37,3	49,3	6,2	2,0	1,5
29. "	38,1	49,1	6,7	2,8	2,3
1. Dez.	38,8	51,4	4,9	2,5	2,3
6. "	39,3	51,8	5,1	1,3	2,5
7. Dezember: Entfernung der Schilddrüse.					
12. Dez.	44,2	42,3	9,3	2,2	2,0
17. "	51,8	35,5	6,6	3,2	2,9
29. "	53,3	35,6	7,1	2,2	1,8
6. Jan.	53,9	36,0	5,1	1,7	3,3
19. Jan.	53,8	36,8	4,7	2,3	2,4

Es folgt auch hier wie bei den ersten Versuchstieren eine graphische Darstellung der Verhältnisse des weißen Blutbildes unter Zugrundelegung der Werte aus den Tabellen XI u. XII.

Tabelle XIII.

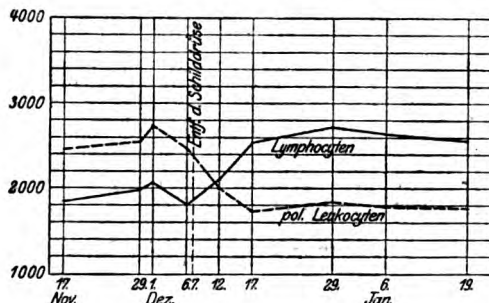


Fig. 2.

Die Protokolle ergeben zunächst, daß durch die Wegnahme der Schilddrüse keine Veränderung des Hämoglobinwertes eintritt, die deutlich außerhalb der normalen Schwankungen fallen würde. In beiden Fällen scheint wohl eine geringe Verminderung einzutreten, die uns aber lediglich folgende Behauptung gestattet: Durch Exstirpation der Schilddrüse tritt im Gegensatz zu den Resultaten nach Exstirpation der Milz keinerlei Steigerung des Hämoglobins ein. Ich erlaube mir schon hier, die beiden Organe in einen gewissen Gegensatz in bezug auf die Blutverhältnisse zu bringen, weil des weiteren noch öfters davon die Rede sein wird.

Deutlicher scheint ein Einfluß auf die Erythrocytenzahl vorhanden zu sein, indem diese doch in einem Maße sinkt und sich konstant auf einem tieferen Stande hält, daß dafür die Operation verantwortlich gemacht werden darf. Die Erscheinungen sind deutlich genug, uns einen Fingerzeig auf eine Beeinflussung des Knochenmarkes zu geben. Es soll dann Aufgabe folgender Versuche sein, zu zeigen, ob wir durch geeignete Maßnahmen imstande sind, diesen Einfluß deutlicher, manifester zutage treten zu lassen.

Die Zahl der weißen Blutzellen verändert sich nicht wesentlich durch die Thyreoidektomie. Dagegen treten im relativen Leukocytenbilde bemerkenswerte Veränderungen ein. Ohne

vorangehende Vermehrung der polymorphkernigen Leukocyten entwickelt sich rasch nach der Operation eine Lymphocytose, die dauernd anhält, eine Tatsache, die mit den Blutbefunden an myxödematösen Menschen übereinstimmt.

Eine einigermaßen einwandfreie Deutung dieser Resultate ist sehr schwer, vielleicht stellen sie den Ausdruck einer herabgesetzten Knochenmarksfunktion dar, vielleicht handelt es sich aber auch nur um eine Reizung des lymphatischen Systems. Wir wissen, daß ohne Schilddrüse der Stoffwechsel sich anders gestaltet, wir wissen ferner, daß der lymphatische Apparat unter dem Einflusse des Nervensystems steht und dieses wiederum durch das Sekret der Schilddrüse verändert wird, daß ein Herausgreifen eines oder mehrerer Glieder aus diesen komplexen Verhältnissen zur Erklärung vorliegender Befunde nicht über die Hypothese hinauskäme. Auffallend ist nur, und das tritt in den Kurven besonders deutlich hervor, daß die Vermehrung der Lymphocytenzahl nicht neben einem gleichbleibenden Verhalten der myeloischen Elemente stattfindet, sondern neben einer dementsprechenden Verminderung derselben.

Es lag nun nach diesen vorausgegangenen Untersuchungen auf der Hand, die Wirkung der Exstirpation von Schilddrüse und Milz am selben Tage zu studieren. Vor allem war es interessant zu untersuchen, ob Kaninchen überhaupt einen derartigen Eingriff ertragen. Die nachfolgenden Protokolle bejahen diese Frage. Nach der Operation zeigten die Tiere in ihrem Verhalten keine wesentlichen Veränderungen, es sei denn eine geringgradige Abmagerung.

Auch hier seien zunächst die Versuchsergebnisse vorausgeschickt:

Tabelle XIV.
Versuchstier 5.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
27. Jan. 16	69	4560000	4725
1. Febr.	65	4200000	4500
3. "	67	4350000	4650
4. Februar: Entfernung von Milz und Schilddrüse.			
10. Febr.	55	3500000	3820
12. "	56	3620000	4000
15. "	58	3850000	4100
18. "	57	3200000	3850
21. "	59	3800000	4200

Tabelle XV.
Versuchstier 5.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
27. Jan.	41,3	50,2	3,3	2,5	2,4
1. Febr.	40,0	54,8	2,1	1,0	2,1
3. "	40,8	54,8	2,8	1,2	2,4
4. Februar: Entfernung von Milz- und Schilddrüse.					
10. Febr.	30,1	60,2	5,3	1,4	3,0
12. "	35,0	58,0	3,5	1,0	2,5
15. "	36,8	56,0	3,6	1,2	2,4
18. "	40,0	51,0	4,8	1,4	2,8
21. "	41,4	50,6	4,1	1,3	2,6

Tabelle XVI.
Versuchstier 6.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Weißer Blutkörperchen
21. Jan.	65	4879000	4800
24. "	67	4920000	4930
25. "	64	4916000	4750
26. "	65	4894000	4870
27. Januar: Entfernung von Milz und Schilddrüse.			
2. Febr.	57	3733000	4250
4. "	56	3702000	4300
7. "	58	3720000	4100
9. "	57	3891000	4000
11. "	58	3800000	4200
13. "	57	3921000	3930
17. "	55	3765000	4460

Tabelle XVII.
Versuchstier 6.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
21. Januar	35,0	56,4	4,0	1,5	3,0
24. "	36,6	55,7	3,8	1,4	3,1
25. "	35,1	55,5	4,0	1,5	3,9
26. "	35,6	55,8	4,2	1,2	3,2
27. Januar: Entfernung von Milz und Schilddrüse,					
2. Februar	18,6	71,5	5,2	1,4	3,3
4. "	20,3	69,0	5,6	1,5	3,6
7. "	25,5	64,9	4,9	1,7	3,1
9. "	30,3	61,2	4,3	1,6	2,5
11. "	36,5	55,6	3,6	1,4	2,9
13. "	35,9	56,1	3,4	1,5	3,1
17. "	37,0	56,5	2,7	0,9	2,8

Es sei auch erwähnt, daß in beiden Fällen durch die Operationen auch das rote histologische Blutbild sich veränderte; wie nach der bloßen Splenektomie traten auch hier Normoblasten in ziemlicher Zahl und Formen mit Jolly-Körperchen auf, Megaloblasten wurden keine beobachtet.

Tabelle XVIII.

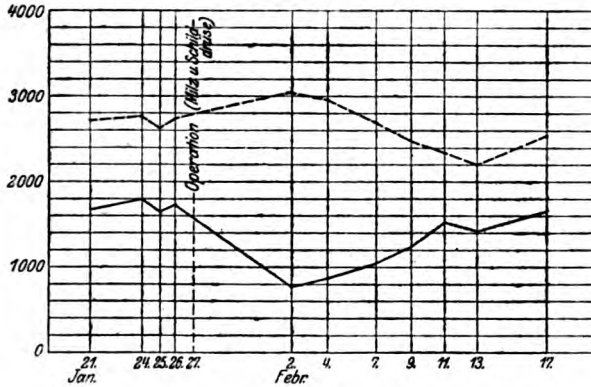


Fig. 3.

Man sieht, die Versuche ergeben im großen und ganzen übereinstimmende Resultate. Vor allem springt der Abfall des Hämoglobins und der Erythrocytenzahl, nach der Operation, in die Augen. A priori erscheint dieses Verhalten ziemlich merkwürdig, denn wir haben ja gesehen, daß die Entfernung bloß der Milz ein Ansteigen des Hämoglobins und der Zahl der roten Blutkörperchen ergibt, die Entfernung der Schilddrüse aber vielleicht eine Herabsetzung dieser Werte. Mathematisch gedacht, war durch die Summation, d. h. durch den Ausfall beider Organe ein anderes Resultat zu erwarten, jedenfalls nicht ein Sturz. Wir haben es aber hier mit biologischen Verhältnissen zu tun. Das zeigt uns auch, daß die Ausfallserscheinungen keine einfachen Vorgänge darstellen, sondern wohl sehr komplexe, bei denen zudem noch durch das kompensatorische Eingreifen anderer Organe der Untersuchung noch vermehrte Schwierigkeiten in den Weg gelegt werden. Vor allem sei an der Tatsache festgehalten, daß die Milz im Blute die Rolle eines Regulators spielt. Ohne dieses Organ fällt einerseits nach Ebnöther eine hämolytische Komponente weg,

andererseits aber auch eine hemmende Wirkung auf das Knochenmark, wie obige Versuche dargetan haben. Nun spielt bei der Komplikation der Verhältnisse noch ein Faktor eine Rolle, nämlich die Tatsache, daß die Hämolyse selber die Hämatopoese beeinflußt. Wir verstehen teleologisch gedacht ganz gut, daß gesteigerter Zerfall roter Blutkörperchen eine Reizung des Knochenmarkes hervorruft, um durch gesteigerte erythroblastische Tätigkeit den Ausfall zu decken. Es ist ja das eine Tatsache, die schon praktisch verwertet worden ist, indem besonders von französischen Autoren angegeben wird, daß Anämien perniziösen Charakters durch Zuführen von hämolytischem Serum gebessert werden, offenbar durch Reizung des Knochenmarkes. Nun werden durch die Milzexstirpation, trotzdem also ein hämolytischer Faktor ausfällt, die Stätten der Blutbildung dennoch gereizt, dem Organ kann also sicher nicht nur eine hämolytische Tätigkeit zuerkannt werden. Dieses festhaltend, können nun vielleicht die Erscheinungen an einem doppelt operierten Tiere unserm Verständnis etwas näher gerückt werden. Die Entfernung der Schilddrüse hemmt bis zu einem gewissen Grade diese gesteigerte Wirkung. Daß der abnorme Reiz des Milzausfalls nicht einfach aufgehoben wird, sondern fortbesteht, dokumentiert sich aus dem Befunde der histologischen Untersuchung des roten Blutbildes. Es ist nämlich oben erwähnt worden, daß nach der Doppeloperation auch unreife Formen von Erythrocyten nachgewiesen werden konnten. Die Schilddrüse gibt normalerweise ein Etwas an das Knochenmark ab, welches dieses unterhält. Fällt nun dieser Reiz weg und wird andererseits gleichzeitig das Knochenmark durch die Entfernung der Milz in einen krankhaften Reizzustand versetzt, so resultiert daraus eine Abnahme von Hämoglobin und roten Blutkörperchen. Oder auch umgekehrt, der Reiz, der durch die Milzexstirpation hervorgerufen wird, trifft ein in seiner Tätigkeit wenn auch nicht manifest, so doch latent herabgesetztes Knochenmark, das Resultat ist wiederum die Anämie.

Da beide Organe miteinander entfernt werden, ist es in diesem Falle schwer zu entscheiden, welche Erscheinung als die primäre angesprochen werden muß. Ich will dazu nur bemerken, daß ich einmal im Laufe der Versuche einem entmilzten Tiere längere Zeit nach dieser Operation, in einem

Momente, wo das Hämoglobin und die Blutkörperchenzahl normale Werte aufwiesen, wo ferner auch die Lymphocytose sich eingestellt hatte, die Schilddrüse noch entfernte, und zwar mit dem Erfolg, daß keine wesentliche Änderung, weder im roten noch im weißen Blutbilde eintrat, wie aus dem beigegebenen Protokoll hervorgeht:

Tabelle XIX.

Versuchstier 7.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
2. März	70	5 114 000	5512
5. "	73	5 365 000	4980
7. "	71	5 020 000	5250
Entfernung der Schilddrüse am früher entmilzten Tiere am 8. März.			
12. März	75	5 459 000	4980
15. "	70	5 145 000	4725
20. "	73	4 988 000	5100

Tabelle XX.

Versuchstier 7.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
2. März	49,3	41,2	4,5	1,9	3,1
5. "	51,1	40,7	3,8	2,4	2,0
7. "	48,1	42,8	4,0	1,7	3,5
8. März: Operation.					
12. März	47,2	42,1	5,2	2,1	3,4
15. "	48,5	40,7	6,2	2,3	3,3
20. "	47,7	42,5	4,4	1,7	3,7

Dieser Befund würde also eher für die zweite Art der Erklärung sprechen, wonach die Milzexstirpation auf veränderte Blutbildungsstätten treffen würde und dadurch die Anämie hervorruft. Doch sind das nur Vermutungen, auch hier mögen vielleicht kompensatorische Vorgänge die Hand im Spiele haben, zudem sind wir ja über den ganzen Mechanismus dieser Erscheinungen keineswegs im klaren, und die angeführten sind auch nur auf Grund physiologischer Überlegungen gegeben worden. Sie haben viel Wahrscheinlichkeit für sich, direkt beweisen lassen sie sich aber nicht.

Kehren wir nun zu unsern Versuchsreihen zurück, so sehen wir, daß der leichte anämische Zustand sich über eine längere Periode erstreckt, er dauert während der Zeit der Beobachtung an.

Charakteristisch ist es auch, daß das Hämoglobin in beiden Fällen nicht proportional der Zahl der roten Blutkörperchen sinkt. Bildet man in der Tat vor und nach der Operation den sogenannten Hämoglobinquotienten, so zeigen sich erhebliche Unterschiede. Dieser Quotient wird in folgender Weise eruiert. Nimmt man Hämoglobinmenge und Blutkörperchenzahl vor der Operation als Norm an und rechnet dann die entsprechenden Werte nach der Operation in Prozenten dieser Norm aus, dividiert man endlich die so gefundenen Zahlen sowohl für Hämoglobin als auch für Erythrocyten, so erhält man einen Wert, der angibt, in welchem Verhältnis sich der Hämoglobingehalt des einzelnen Blutkörperchens gegenüber dem normalen verschoben hat.

Haben Hämoglobin und Erythrocyten proportional abgenommen, so ist diese Zahl gleich 1.

Legt man hier nach Tabelle XVI die Mittelwerte der drei letzten Untersuchungen vor und der drei ersten Untersuchungen nach der Operation zugrunde, so kommt man zu folgendem Resultate:

$$\frac{\frac{57}{65}}{\frac{371}{491}} = 1,12.$$

Der Wert ist größer als 1 und beweist somit, daß die Abnahme der Erythrocyten verhältnismäßig größer ist als die Abnahme der Hämoglobinmenge.

Die Operationen boten auch in bezug auf das weiße Blutbild interessante Veränderungen dar. Wenn wir uns zunächst die Tabellen XIV und XVI vor Augen halten, so konstatieren wir in beiden Fällen eine wenn auch nicht starke, so doch deutliche Abnahme der Leukocytenzahl. Einer derartigen Erscheinung sind wir weder bei der Milzexstirpation noch bei der Wegnahme der Schilddrüse begegnet. Die Verhältnisse liegen also ganz analog wie bei den roten Blutkörperchen. Da

ist nun die Betrachtung der morphologischen Befunde geeignet, vielleicht etwas mehr Licht in diese Erscheinungen zu bringen.

Es wird aufgefallen sein, daß bis dahin nur das Verhalten der polymorphkernigen Leukocyten und der Lymphocyten in den Kreis unserer Diskussionen gezogen worden ist. Die andern Zellarten finden sich auch nur der Vollständigkeit halber in den Protokollen. In der Tat würde es außerordentlich schwer halten, aus Veränderungen der Übergangsformen, der großen Mononukleären und der Basophilen Schlüsse physiologischer Natur zu ziehen. Denn wenn unsere Kenntnisse über Leukocyten und Lymphocyten mangelhaft sind, so sind sie es für diese andern Zellen noch mehr. Zudem weisen sie durch die Operation keine so deutlichen Veränderungen auf. Die Übergangszellen stellen Knochenmarkselemente dar, sie finden sich auch hier allgemein bei Knochenmarksreizung etwas vermehrt. Die Stellung der großen mononukleären Zellen im System ist noch nicht ganz klar. Die Basophilen wiederum entstammen dem Knochenmarke. Die Verhältnisse liegen aber so, daß physiologische Deduktionen allzu gewagt erscheinen würden.

Was vor allem im morphologischen weißen Blutbilde auffällt, ist die starke Abnahme der Lymphocyten nach der Operation, das eine Mal von 40,8 % auf 30,1 %, das andere Mal von 35,6 % auf 18,6 %, oder dieses zweite Resultat in absolute Werte umgerechnet, von 1800 auf 800, wie aus der graphischen Darstellung hervorgeht. Nur langsam erfolgt dann die Erholung, sie bedarf fast eines ganzen Monats.

Die polymorphkernigen Leukocyten steigen relativ und auch absolut etwas. Vergleichen wir aber ihre Kurve aus Tabelle XVIII mit der entsprechenden aus Tabelle VII, beim Miltztier, so sehen wir, wie außerordentlich flacher sie beim doppeltoperierten Tiere verläuft, und doch weist uns der relative Befund auf eine Reizung des myeloischen Systems hin, so daß auch hier die genauere Differenzierung nach Arneth angezeigt erschien. Diese wurde auch ausgeführt und ergab bei Versuchstier 6 folgendes Resultat:

Tabelle XXI.

Versuchstier 6.

Datum	Myelo- cyten	Mit wenig eingebuchtetem Kern	Mit tief eingebuchtetem Kern	Mit 2 Kernen	Mit 3 Kernen	Mit 4 Kernen
24. Januar	0	2	7	55	28	9
26. "	0	1	6	56	30	7
27. Januar Operation (Milz und Schilddrüse entfernt)						
2. Februar	5	6	8	62	17	2
7. "	4	6	7	63	18	2
11. "	2	3	9	62	21	3

Die Analogie zu den Befunden, wie sie aus den Tabellen VIII und IX vorliegen, fällt sofort auf.

Einer Verschiebung des Arnethschen Blutbildes ist allerdings nicht in jedem Falle die gleiche Bedeutung zuzumessen. Kommt sie nur bei einer gewöhnlichen Leukocytose vor und geht sie dann in dem Maße, als die Leukocytose wieder abnimmt, nach rechts zurück, so kommt der Erscheinung weiter keine Bedeutung zu, als die des Ausdrucks einer gesteigerten Tätigkeit des Knochenmarkes. Tritt jedoch die Erscheinung zu einer Zeit auf, wo keine gesteigerte Leukocytenabgabe vorhanden ist, so weist sie auf ein krankhaftes, geschwächtes Knochenmark hin. In obigen Versuchen geht die Linksverschiebung mit der Zeit zurück, sie weist also auf eine gesteigerte Knochenmarksfunktion hin, die allerdings bei den Tieren ohne Milz und Schilddrüse nicht so zur Geltung kommt wie beim bloß splenektomierten Tiere, weil offenbar das Vorhandensein der Thyreoidea ein erregendes Moment bedingt. Mit der Zeit entwickeln sich allerdings Verhältnisse wie beim entmilzten Tiere, indem es schließlich doch auch zu einer Lymphocytose kommt, wie spätere Untersuchungen ergeben haben. Der Vorgang erfolgt aber außerordentlich viel langsamer.

Zum Schlusse dieses ersten Teiles der Arbeit seien nun die wichtigsten Resultate zusammengefaßt noch angeführt:

1. Die Milzexstirpation führt bei eisenreich ernährten Tieren zu einer vorübergehenden Erhöhung des Hämoglobins und der Erythrocytenzahl.

2. Neben der hämolytischen Komponente, die dabei ausfällt, muß ein direkter Reiz auf das Knochenmark angenommen

werden, da diese dauernd unreife Formen roter Blutkörperchen an die Zirkulation abgibt.

3. Die Operation führt zu keiner wesentlichen Änderung der Zahl der weißen Blutkörperchen, dagegen verursacht sie zunächst eine Abnahme der Lymphocytenzahl, mit einer entsprechenden Zunahme der polymorphkernigen Elemente, eine Erscheinung, die erstens als Schädigung des lymphatischen Apparates und zweitens unter Zuhilfenahme weiterer Differenzierung nach Arneht und Ausschluß allgemeiner Operationsfolgen, als Ausdruck einer Reizwirkung auf das leukopoetische System gedeutet wird.

4. Mit der Zeit entwickelt sich bei entmilzten Tieren eine relative Lymphocytose. Der Vorgang wird als Hyperkompensation aufgefaßt.

5. Die Entfernung der Schilddrüse bewirkt eine sehr geringe Abnahme der Erythrocytenzahl, während das Hämoglobin wesentlich auf der gleichen Höhe bleibt. Das deutet auf die latente Hemmung des erythroblastischen Systems hin.

6. Die Operation ruft eine sofort einsetzende Lymphocytose hervor, deren Erklärung nicht eindeutig erfolgen kann.

7. Werden bei einem Kaninchen Milz und Schilddrüse in einer Sitzung entfernt, so entsteht eine leichte Herabsetzung des Hämoglobins und eine verhältnismäßig bedeutendere Abnahme der Erythrocyten. Diese Erscheinung tritt nicht ein, wenn die Schilddrüse an einem früher entmilzten Tiere weggenommen wird.

8. Bei einem derartig leichtanämischen Tiere besteht aber der durch die Splenektomie bedingte Reiz auf das Knochenmark fort, denn auch hier gibt dieses unreife Formen an das Blut ab. Wahrscheinlich trifft dieser Reiz auf ein durch die Wegnahme der Schilddrüse in seiner Tätigkeit gehemmes System.

9. Auch die Zahl der weißen Blutzellen sinkt durch die Doppeloperation.

10. Das morphologische relative Blutbild verhält sich unter Ausschaltung des Zeitfaktors gleich wie das Blutbild nach der Splenektomie. Der stabile Zustand tritt aber erst nach längerer Zeit ein.

11. In bezug auf die Blutbildung kann von einer Art Antagonismus zwischen Milz und Schilddrüse gesprochen werden, obschon die Mechanismen dabei wahrscheinlich ganz verschiedene sind. Die Schilddrüse würde im Sinne einer Erregung, die Milz im Sinne einer Hemmung wirken.

Einfluß von Cyanwasserstoff auf Kontroll- und Versuchstiere.

Es ist bekannt, daß der Sauerstoffmangel ein Mittel ist, die blutbildenden Organe zu erregen. Dieser kann auf verschiedene Weise erzeugt werden, hier wurde die experimentelle Dyspnöe durch das Cyan hervorgerufen. Ich wurde speziell auf dessen Verwendung geführt, weil sowohl Mansfeld als auch Sollberger sich seiner unter anderm bedient haben. Durch die Blausäure wird der normale Gaswechsel im Körper gestört. Das Blut, das die Capillaren passiert, gibt nicht wie sonst seinen Sauerstoff ab, sondern behält auch in den Venen je nach der zugeführten Dosis mehr oder weniger seine hellrote Farbe. Die Gewebe sind wahrscheinlich durch Fermentlähmung nicht mehr imstande, den Sauerstoff in normaler Weise aufzunehmen.

In Form von Aqua amygdalarum amarum kann Cyanwasserstoff genau dosiert werden, und deshalb wurde auch hier dieses Präparat benutzt. Aqua amygdalarum amarum enthält 0,1 % HCN. Der Cyanwasserstoff wirkt auch auf das Knochenmark vorübergehend Sauerstoff entziehend. Da nun einerseits der Bestand besonders der roten Blutkörperchen durch eine sehr feine Regulation ziemlich konstant erhalten wird, da der Untergang roter Blutkörperchen selber einen Reiz für das erythroblastische System darstellt, wir aber andererseits gesehen haben, daß sowohl die Milz als auch die Schilddrüse einen Einfluß auf dieses System haben, erschien es interessant, den Sauerstoffmangel als Reiz zu benutzen, um so mehr als die Mansfeldsche Arbeit direkt den Angriffspunkt des Sauerstoffmangels für die Wirkung auf das Knochenmark, in die Schilddrüse verlegt hatte.

Es ist aber vielleicht zunächst vorsichtiger, um nichts zu präjudizieren, die Fragestellung neutraler zu fassen und sie in folgender Weise zu stellen: Wie reagiert das Blutbild eines

Normaltieres, eines milzlosen, eines schilddrüsenlosen und eines doppeltoperierten Tieres auf geringe Mengen Cyanwasserstoff? Wie schon oben erwähnt, wurde Aqua amygdalarum amarum benutzt.

Tabelle XXII.

Kontrolltier.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
10. Februar	75	4 769 000	5000
Injektion von 1 mg HCN.			
5 Stunden nach der Injektion:			
	64	3 545 000	5200
12 Stunden nach der Injektion:			
	68	3 850 000	6000
30 Stunden nach der Injektion:			
	75	5 025 000	5600
50 Stunden nach der Injektion:			
	76	5 200 000	4750
6 Tage nach der Injektion:			
17. Februar	72	4 600 000	4980
20. "	74	4 800 000	5250

Tabelle XXIII.

Kontrolltier.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
10. Februar	35,6	54,4	3,4	2,6	4,0
Injektion von 1 mg HCN.					
5 Stunden nach der Injektion:					
	36,3	55,2	3,8	1,5	3,1
12 Stunden nach der Injektion:					
	40,1	52,0	3,1	1,7	3,1
30 Stunden nach der Injektion:					
	61,5	31,0	2,0	1,8	1,8
50 Stunden nach der Injektion:					
	42,2	50,5	3,2	1,2	2,9
6 Tage nach der Injektion:					
17. Februar	36,9	55,9	3,2	1,6	2,4
20. "	36,7	54,3	4,5	1,5	3,0

Um auch hier einen bessern Begriff von den absoluten Veränderungen des weißen Blutbildes zu geben, seien die Verhältnisse graphisch dargestellt:

Tabelle XXIV.

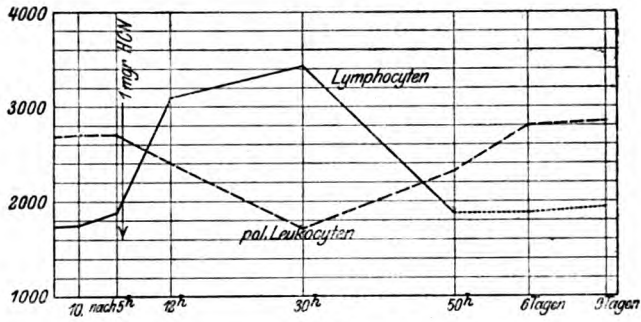


Fig. 4.

Verweilen wir einen Augenblick bei diesen Resultaten, so sehen wir, daß durch den Cyanwasserstoff erstens einmal das Hämoglobin und die Zahl der roten Blutkörperchen einen Sturz erfahren, daß zweitens im Gegenteil die Zahl der Leukocyten im peripheren Blute ansteigt. Die morphologische Untersuchung letzterer ergibt endlich, daß dieser Anstieg nicht auf einem proportionalen Anwachsen beider Hauptarten beruht, sondern, daß es die Lymphocyten sind, die in exzessivem Maße auftreten, während im Gegenteil die Knochenmarkselemente abnehmen. Nach 30 Stunden sind für das rote Blutbild die Er-

Tabelle XXV.

Versuchstier 8 (entmilzt).

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
4. März	73	5 020 000	4980
6. "	72	4 990 000	4820
8. "	74	5 125 000	5280
Injektion von 1 mg HCN.			
5 Stunden nach der Injektion:			
	67	4 260 000	5500
12 Stunden nach der Injektion:			
	70	4 670 000	5000
30 Stunden nach der Injektion:			
	77	5 080 000	4500
3 Tage nach der Injektion:			
	81	5 200 000	4600
15. März	75	5 020 000	4920

scheinungen abgeklungen, erst aber nach 50 Stunden kehren im weißen Blutbilde normale Verhältnisse wieder. Es ist wohl vorläufig geratener, sich irgendeiner Deutung zu enthalten, sie müßte sich auf allzu unsichere Annahmen stützen. So sollen die Resultate zunächst als Giftwirkung registriert werden und die Untersuchung am entmilzten Tiere folgen.

Tabelle XXVI.

Versuchstier 8.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
4. März	52,3	39,2	4,2	1,3	2,0
6. "	54,5	38,1	3,6	2,1	1,7
8. "	53,3	39,0	3,2	2,1	2,4
Injektion von 1 mg HCN.					
5 Stunden nach der Injektion:					
	58,3	33,2	4,1	2,2	2,2
12 Stunden nach der Injektion:					
	57,1	35,3	4,0	1,6	2,0
30 Stunden nach der Injektion:					
	54,4	35,5	4,7	2,0	3,4
50 Stunden nach der Injektion:					
	55,1	36,7	4,2	1,5	2,5
3 Tage nach der Injektion:					
15. März	54,1	38,6	3,3	1,9	2,1
	55,2	37,9	2,8	2,1	2,0

Die Unterschiede gegenüber dem Normaltiere fallen sofort auf. Beim milzlosen Tiere ist der Verlust an Hämoglobin und roten Blutkörperchen auf den gleichen Eingriff hin wesentlich geringer. Das Knochenmark befindet sich eben in einem größeren Reizzustand, was sich besonders auch in der Tatsache dokumentiert, daß die Erholung über die Norm hinausgeht, ein neues Argument für die früher entwickelte Anschauung einer regulierenden Funktion der Milz. Der Reiz des Cyanwasserstoffs klingt allerdings bald wieder ab, so daß nach einer Woche wieder normale Verhältnisse angetroffen werden.

Eine andere Möglichkeit der Erklärung bestünde allerdings noch darin, daß die Erythrocyten des milzlosen Tieres resistenter wären, als die des normalen. Dafür würde der geringe Sturz derselben, nach der Injektion, sprechen. Irgendwelche Resistenzveränderungen der roten Blutkörperchen konnte Ebnöther

bei seinen Hämolyseversuchen nicht feststellen, und wenn auch der Chemismus bei der Cyanwasserstoffvergiftung ein ganz verschiedener wäre, daß diese Untersuchungen nicht als maßgebend gelten könnten, würde sich der große Anstieg in der Erholungszeit damit nicht erklären. Endlich erscheint es doch sehr unwahrscheinlich, daß die Wegnahme eines Organs wie die der Milz eine derartige Wirkung haben sollte. Das zwingt uns zu unserer ersten Annahme zurück.

Auch die weißen Blutelemente reagieren anders als beim Normaltiere. Die Injektion erzeugt hier nur eine geringere Leukocytose, im morphologischen Bilde sind es allerdings wieder die Lymphocyten, die ansteigen, während die Zahl der polymorphkernigen Leukocyten nur relativ sinkt, absolut sich aber ungefähr auf gleicher Höhe hält. Die Veränderung ist eine geringere, obschon zu bedenken ist, daß die Splenektomie schon an und für sich eine dauernde Lymphocytose hervorruft. Vorläufig bieten sich der Erklärung dieser Erscheinung verschiedene Wege, auf die aber erst eingetreten werden soll nach Untersuchung der andern Versuchstiere, die vielleicht geeignet ist, die Deutungsmöglichkeiten etwas besser zu fixieren.

Tabelle XXVII.

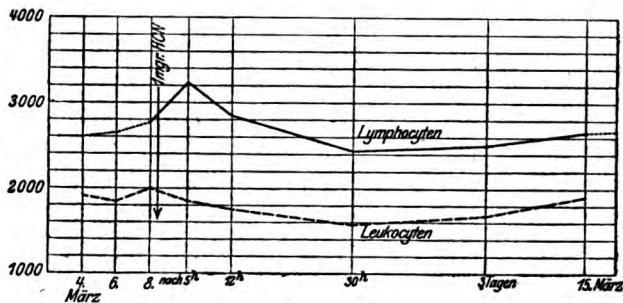


Fig. 5.

Die Versuche zeigen, daß durch die Einverleibung von geringen Dosen Cyanwasserstoff, bei einem schilddrüsenlosen Tiere, keine deutliche Veränderung des roten Blutbildes eintritt. Auch wenn die doppelte Dosis verabfolgt wird, so fallen die Untersuchungsergebnisse nicht außerhalb der normalen Schwankungen. Dieser Befund stimmt also vollkommen mit denjenigen

Tabelle XXVIII.

Versuchstier 9 (schilddrüsenlos).

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
2. Febr.	76	4860 000	4978
10. "	75	4957 000	4725
Injektion von 1 mg HCN.			
5 Stunden nach der Injektion:			
	75	4737 000	5250
12 Stunden nach der Injektion:			
	74	4988 000	4987
30 Stunden nach der Injektion:			
	72	5020 000	5100
14. Februar: Injektion von 2 mg.			
6 Stunden nach der Injektion:			
	74	4975 000	4750
12 Stunden nach der Injektion:			
	75	5114 000	5200
30 Stunden nach der Injektion:			
	75	4894 000	4987
3 Tage nach der Injektion:			
17. Febr.	78	5050 000	4500
22. "	76	4925 000	4850

Mansfelds überein, die besagen, daß die Wirkungen des Sauerstoffmangels auf das Blut nicht eintreten, wenn die Schilddrüse entfernt ist, in vollkommener Analogie zum Verhalten des Eiweißstoffwechsels unter diesen Bedingungen. Ob der Mechanismus dabei mit dem veränderten N-Stoffwechsel zusammenhängt, fällt außerhalb des Kreises unserer Betrachtungen. Es sei da auf die Mansfeldschen Arbeiten verwiesen. Wir betonen noch einmal, daß nach dieser Richtung hin hier nichts präjudiziert werden soll. Halten wir uns bloß an die vorliegenden Befunde.

Die vollkommene Analogie in den Erscheinungen bei Sauerstoffmangel gestattet uns wohl, die Injektion geringer Dosen von Cyanwasserstoff als Reiz auf die blutbildenden Organe zu betrachten. So läßt sich vielleicht mehr Licht in diese Verhältnisse bringen, und diese können dann ungezwungen in die Reihe der schon gewonnenen Erfahrungen eingeordnet werden. Wie bei der Reizung durch hämolytisches Serum, von der oben einmal die Rede war, so sind auch bei der Reizung durch Aqua amygdalarum amarum zwei Phasen zu unterscheiden.

Tabelle XXIX.
Versuchstier 9.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
2. Febr.	55,1	37,0	3,6	2,1	2,1
10. "	54,5	37,1	4,1	2,0	2,3
Injektion von 1 mg HCN.					
5 Stunden nach der Injektion:					
	54,1	38,9	2,9	1,3	2,8
12 Stunden nach der Injektion:					
	56,2	37,1	4,1	1,2	1,4
30 Stunden nach der Injektion:					
	55,8	38,2	2,3	1,3	2,4
14. Februar: Injektion von 2 mg HCN.					
6 Stunden nach der Injektion:					
	57,5	35,1	3,3	1,2	2,5
12 Stunden nach der Injektion:					
	55,3	37,9	3,1	1,5	2,2
30 Stunden nach der Injektion:					
	55,1	36,7	3,7	1,8	2,7
nach 3 Tagen:					
17. Febr.	55,4	37,9	3,2	1,1	2,4
22. "	54,4	39,2	3,2	1,0	2,2

Tabelle XXX.

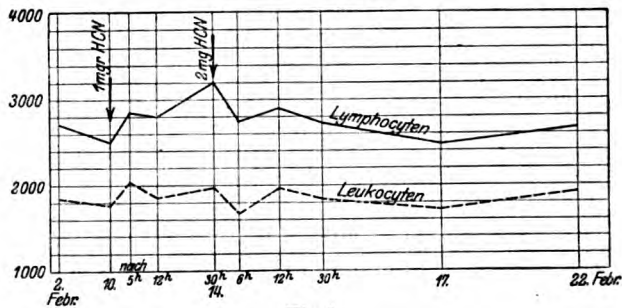


Fig. 6.

zunächst eine toxische, die dann erst, vielleicht gerade durch diese schädigende Wirkung, als Reaktion nachher eine gesteigerte Tätigkeit des erythroblastischen Apparates zur Folge hat. Das normale Tier reagiert infolgedessen zunächst mit einer Abnahme des roten Blutes, dann tritt baldige Erholung ein. Das milzlose Tier mit seiner gesteigerten Knochenmarksfunktion reagiert ebenfalls zuerst mit einer geringen Abnahme, die dann

aber bald eine Überproduktion zur Folge hat. Beim schildrüsenlosen Tiere ist das Knochenmark gehemmt, der Reiz wirkt infolge dieser herabgesetzten Reaktionsfähigkeit weder im negativen noch im positiven Sinne.

Auch das weiße Blutbild weist keine ausgesprochenen Veränderungen auf, wie die graphische Darstellung besonders deutlich zeigt.

Diese Befunde ließen die Resultate bei doppeltoperierten Tieren mit gespanntem Interesse erwarten:

Tabelle XXXI.
Versuchstier 10.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
29. Febr.	60	4074000	4462
1. März	59	4204000	4200
3. "	61	4141000	4500
Injektion von 1 mg HCN.			
5 Stunden nach der Injektion:			
	55	3765000	4987
12 Stunden nach der Injektion:			
	56	3670000	4725
30 Stunden nach der Injektion:			
	59	3953000	5100
6. März	61	4110000	4300

Tabelle XXXII.
Versuchstier 10.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
29. Febr.	36,2	56,3	3,3	2,5	2,7
1. März.	37,6	56,5	3,5	1,5	2,9
3. "	36,9	55,2	4,3	2,5	3,1
Injektion von 1 mg HCN.					
5 Stunden nach der Injektion:					
	36,6	55,5	3,5	1,4	3,1
12 Stunden nach der Injektion:					
	39,5	52,2	4,1	1,5	2,7
30 Stunden nach der Injektion:					
	43,2	48,0	4,0	3,0	1,8
6. März	37,0	56,5	2,7	0,9	1,2

Der Befund schien wichtig genug, um seine Kontrolle an einem weiteren Tiere auszuüben.

Tabelle XXXIII.

Versuchstier 11.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
12. März	57	4329 000	4250
15. "	59	4114 000	4330
18. "	60	4204 000	4725
Injektion von 1 mg HCN.			
6 Stunden nach der Injektion:			
	52	3702 000	5100
12 Stunden nach der Injektion:			
	55	3890 000	4987
30 Stunden nach der Injektion:			
	58	4016 000	4462
21. März	59	3984 000	4200

Tabelle XXXIV.

Versuchstier 11.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
12. März	39,0	54,0	3,5	1,0	2,5
15. "	38,8	53,0	3,6	1,2	2,4
18. "	40,0	51,1	4,7	1,4	2,8
Injektion von 1 mg HCN.					
6 Stunden nach der Injektion:					
	42,4	49,6	4,1	1,3	2,6
12 Stunden nach der Injektion:					
	45,2	48,1	3,2	1,0	2,5
30 Stunden nach der Injektion:					
	43,2	50,1	4,0	1,2	1,5
21. März	40,9	52,3	3,7	2,0	3,1

In Kurven dargestellt gestalten sich die Verhältnisse der weißen Blutzellen folgendermaßen:

Tabelle XXXV.

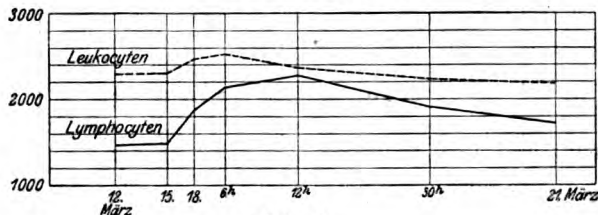


Fig. 7.

Soweit die Untersuchungen. Man sieht also, daß die Reaktion des Hämoglobins und der Erythrocyten, die beim schilddrüsenlosen Tiere verschwunden war, hier wiederkehrt. Auf die Injektion von *Aqua amygdalarum amarum* hin tritt jedesmal ein Sturz ein, nach drei Tagen sind die Verhältnisse wieder normal. Sie übersteigen hier die Norm nicht, wie bei einem bloß splenektomierten Tiere. Die Erholung gestaltet sich auch etwas langsamer. Dieser Befund scheint nun sehr dafür zu sprechen, daß die Reaktion auf Sauerstoffmangel nicht absolut an das Vorhandensein der Schilddrüse gebunden ist, sondern daß die Thyreoidea normalerweise das Knochenmark sensibilisiert, die Entfernung der Schilddrüse setzt die Blutbildungsstätten in ihrer Reaktionsfähigkeit herab. Erhält aber das Knochenmark durch die Entfernung der Milz einen abnormen Reiz, so kehrt diese Reaktionsfähigkeit wieder. Diese Resultate sind also sehr wohl mit den im ersten Teile der Arbeit gefundenen in Einklang zu bringen.

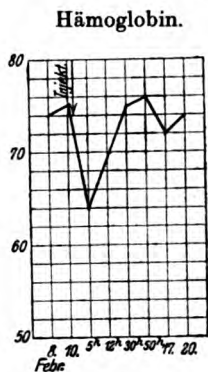
Es mag nun noch wünschenswert sein, das Verhalten des Hämoglobins der verschiedenen Tiere bei dieser Versuchsreihe bildlich zu vergleichen. Da die Erythrocyten im allgemeinen die gleichen Veränderungen dargeboten haben, verzichte ich auf eine spezielle Darstellung ihrer Veränderungen.

Zum Schluß erübrigt es sich noch, auf eine kurze Betrachtung der Verhältnisse der Leukocyten einzugehen. Die Verabreichung von Cyanwasserstoff erzeugt eine Lymphocytose, die mit einer Ausnahme, beim schilddrüsenlosen Tiere nämlich, überall zum Ausdrucke kommt. Besonders ausgesprochen beim Kontrolltierre, ist sie es etwas weniger beim doppeltoperierten und am wenigsten beim entmilzten Tiere. Der Befund des roten Blutbildes am schilddrüsenlosen Tiere, das Fehlen einer Reaktion hatten auch im weißen Bilde keine wesentliche Änderung erfahren lassen.

Wie schon in der Einleitung hervorgehoben worden ist, sind wir über die Funktionen der einzelnen Leukocytenarten sehr wenig unterrichtet. Von den polymorphkernigen Leukocyten wissen wir, daß sie Träger wichtiger Fermente sind, so auch von Oxydasen. Es wäre ja denkbar, daß der Reiz des Sauerstoffmangels oder in unserm Falle des Cyanwasserstoffs eine andere Verteilung des Blutes im Körper bedingt, die um so

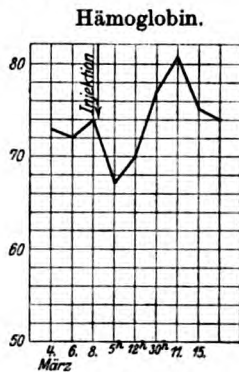
ausgesprochener ist, je intakter die Rezeptibilität der in Betracht kommenden Organe ist. Letztere wird, wie zur Genüge dargetan worden ist, verändert durch die Entfernung der Milz und der Schilddrüse. Da durch die Entfernung beider Organe die Veränderungen sich z. T. aufheben, ist es verständlich, daß

Tabelle XXXVI.



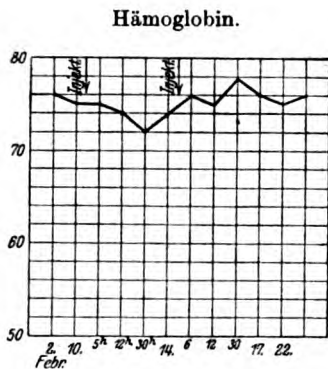
Kontrolltier.

Fig. 8.



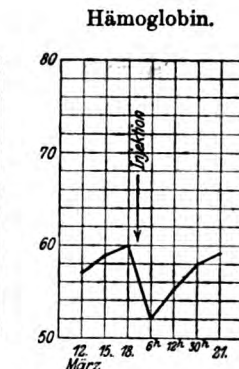
Entmilztes Tier.

Fig. 9.



Schilddrüsenloses Tier.

Fig. 10.



Schilddrüsen u. milzloses Tier.

Fig. 11.

in diesem Falle die Reaktion sich wieder derjenigen des Normaltieres nähert. Ich glaube nicht, daß es gegenwärtig erlaubt ist, über diese skizzierte allgemeine Formulierung hinaus auf weitere Einzelheiten einzugehen, will man nicht allzusehr der Hypothese das Wort lassen.

Aus einem Überblick über diesen 2. Teil der Arbeit läßt sich das Wichtigste wie folgt hervorheben:

1. Der Reiz des Sauerstoffmangels, hervorgerufen durch Cyanwasserstoff in Form von Aqua amygdalarum amarum, dokumentiert sich bei einem normalen Tiere in einer kurzdauernden Abnahme von Hämoglobin und Erythrocytenzahl. Die Erholung erfolgt nicht wesentlich über die Norm hinaus.

2. Beim milzlosen Tiere ist der Sturz geringer und führt zu einer Regeneration über die Norm hinaus.

3. Die Wirkung dieser experimentellen Dyspnöe tritt bei einem schilddrüsenlosen Tiere nicht ein, auch wenn doppelte Dosen verabfolgt werden.

4. Die Wirkung kehrt aber wieder, wenn einem Tiere neben der Schilddrüse auch noch die Milz entfernt worden ist.

5. Diese Tatsachen stützen die im ersten Teile gefundenen Argumente, wonach die Reizungsfähigkeit des Knochenmarks durch die Exstirpation der Thyreoidea aber herabgesetzt wird.

6. Der kurzdauernde experimentelle Sauerstoffmangel durch Cyanwasserstoff verändert das weiße Blutbild im Sinne einer Lymphocytose, die beim intakten und beim doppelt operierten Tiere besonders deutlich, beim milzlosen Tiere weniger und beim schilddrüsenlosen gar nicht zum Ausdruck kommt. Obschon über den Mechanismus nichts präjudiziert wird, erhält dadurch die Annahme, daß die Wirkungen beider Organe auf die hämatopoetischen Apparate einander z. T. entgegengesetzt sind und sich bei gleichzeitigem Eingreifen bis zu einem gewissen Grade aufheben, eine neue Stütze.

Verhalten der Tiere gegenüber experimenteller Anämie.

Die bis dahin gewonnene Erkenntnis im Verhalten der Tiere führte uns aus leicht verständlichen Gründen zu einer weiteren Frage. Es handelte sich darum, die Regeneration bei der künstlich hervorgerufenen Anämie zu untersuchen.

Zur Erzeugung von Anämien kann man sich verschiedener Mittel bedienen, ein sehr bequemes ist das Phenylhydrazin: $C_6H_5-NH-NH_2$, das speziell als Blutgift wirkt. Die Versuche wurden so angestellt, daß nach den nötigen Voruntersuchungen die Tiere proportional ihrem Gewichte salzsaures Phenylhydrazin subcutan erhielten und dann der Grad der

Anämie untersucht wurde. Da es sich nicht darum handelte, eine möglichst langdauernde Anämie zu erhalten, wurde das Gift auf einmal verabreicht. Es ist bekannt, daß bei dieser Anwendung die Regeneration bald erfolgt, sie wird erst hintangehalten, wenn das Phenylhydrazin in refracta dosi einverleibt wird. Das hätte aber die Resultate getrübt, da es sich darum handelte, vergleichende Werte in bezug auf die Rekonvaleszenz bei den verschiedenen Tieren zu erhalten. Das Gewicht der Tiere wurde berücksichtigt, um einen Anhaltspunkt zur Dosierung zu erhalten, um also möglichst gleichwertige Verhältnisse zu schaffen. Die Dosen mußten zunächst in Voruntersuchungen empirisch festgestellt werden. Ich benutzte jeweils eine immer frisch bereitete, kaltgesättigte Lösung von Phenylhydrazin hydrochloric. Die so injizierten Mengen finden sich in den Protokollen.

Tabelle XXXVII.

Kontrolltier.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
29. April	75	4800 000	5620
Injektion von 2 ccm Lösung:			
1. Mai	27	1506000	12075
5. "	40	2478000	9712
9. "	65	3702000	7350
11. "	75	4925000	5200
13. "	78	5114000	5512
15. "	74	4988000	4987

Tabelle XXXVIII.

Kontrolltier.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
29. April	36,5	54,0	4,5	2,0	3,0
Injektion von 2 ccm Lösung:					
1. Mai	48,6	43,2	4,0	1,8	2,0
5. "	33,5	60,8	3,0	4,2	2,4
9. "	34,2	58,1	3,6	2,3	1,8
11. "	35,1	57,3	4,2	1,3	2,1
13. "	34,5	58,3	3,8	1,2	2,2
15. "	36,3	56,5	4,1	1,0	2,4

Der Erfolg der Injektion ist also beim Kontrolltiere eine kolossale Abnahme von Hämoglobin und Erythrocytenzahl, fällt doch z. B. ersteres von 75 auf 27 herunter. Die Erholung setzt aber bald wieder ein, 14 Tage nach dem Eingriff treffen wir wieder normale Verhältnisse im roten Blute. Aber auch die weißen Blutzellen beteiligen sich an den Veränderungen, sie steigen stark in ihrer Zahl, und zwar zunächst besonders die Lymphocyten. Welche chemotaktischen Vorgänge dabei im Spiele sind, soll nicht näher untersucht werden, wichtiger für uns ist die Tatsache, daß im Moment, wo sich das Tier

Tabelle XXXIX.

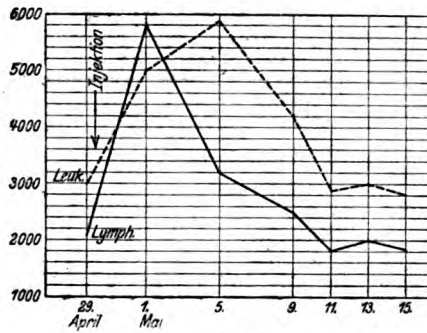


Fig. 12.

zu erholen beginnt, im weißen Blutbilde der Umschlag erfolgt, jetzt sind es die Knochenmarkzellen, die polymorphkernigen Leukocyten, die vermehrt auftreten, und diese Leukocytose zieht sich über die ganze Erholungszeit hin. Ich glaube in dieser letzteren Tatsache einen ähnlichen Vorgang erblicken zu dürfen wie bei den posthämorrhagischen Leukocytosen, die die polymorphkernigen betrifft. Diese Leukocytosen nach Blutverlusten dürften nun ungefähr einen Anhaltspunkt abgeben für das Maß der Knochenmarkstätigkeit. Als solches wird sie auch hier zu betrachten sein. Sie stellt den Ausdruck einer erhöhten hämatopoetischen Tätigkeit dar, wie sie naturgemäß durch die Anämie auftritt.

Das entmilzte Tier verhielt sich folgendermaßen:

Tabelle XL.
Versuchstier 12.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
23. März	75	4957 000	4850
24. "	73	4831 000	4920
Injektion von 2 ccm Lösung:			
25. März	30	1631 000	9570
27. "	25	1411 000	10200
30. "	55	3137 000	6750
2. April	76	4894 000	5200
4. "	80	5114 000	4860
8. "	77	5082 000	4750

Tabelle XLI.
Versuchstier 12.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
23. März	54,3	38,5	3,2	1,3	2,7
24. "	53,1	39,3	4,1	1,5	2,0
Injektion von 2,2 ccm Lösung:					
25. März	61,3	30,6	4,2	1,8	2,1
27. "	63,2	29,1	4,1	1,8	1,8
30. "	28,1	62,2	3,2	2,4	4,1
2. April	28,0	65,5	3,2	1,3	2,0
4. "	42,1	48,1	3,8	2,1	3,9
8. "	51,3	40,5	4,2	2,3	1,7

Auch beim entmilzten Tiere tritt also ein starker Sturz im roten Blutbilde ein. Durch die Injektion von 2,2 ccm Lösung sinkt das Hämoglobin von 75 auf 25, die Erythrocytenzahl bewegt sich von 4900000 auf 1400000.

Die Erholung geschieht aber außerordentlich rasch, gegenüber den 14 Tagen beim Kontrolltier benötigt sie hier bloß deren 9. Da steht das Hämoglobin wieder auf 76, bleibt aber nicht dabei, sondern schießt über diesen normalen Wert hinaus. Der Versuch zeigt mit aller Deutlichkeit, daß die Splenektomie eine Überempfindlichkeit des Knochenmarkes hervorruft, einen krankhaften Reizzustand. Die Regulation ist ausgeschaltet, der Apparat arbeitet wohl intensiver, aber auch weniger ökonomisch, fanden doch vorausgegangene Arbeiten eine vermehrte Eisenausscheidung. Wie zu erwarten war, beantwortet das

weiße Blutbild die Vergiftung mit einer Lymphocytose. Ihr macht, sowie die Erholung einsetzt, eine gewaltige polymorphkernige Leukocytose Platz, auch hier Zeugnis ablegend von der riesigen Tätigkeit des blutbildenden Systems.

Tabelle XLII.

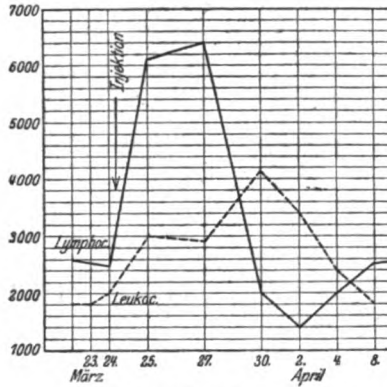


Fig. 13.

Das Verhalten des schilddrüsenlosen Tieres:

Tabelle XLIII.

Versuchstier 13.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
18. März	76	5 114 000	4720
21. "	72	4 957 000	4950
Injektion von 1,9 cem Lösung:			
22. März	35	2 008 000	11 500
24. "	20	1 286 000	11 812
29. "	45	2 823 000	6825
4. April	57	3 451 000	5250
6. "	60	3 953 009	4900
8. "	68	4 110 000	4980
11. "	70	4 329 000	5100
15. "	72	4 674 000	4920
17. "	70	4 737 000	4800

Anfangs treten also auch hier die gleichen Erscheinungen auf wie beim splenektomierten Tiere, die Erholungszeit erstreckt sich aber über volle 25 Tage, und nach diesen zeigt sich auch hier keinerlei Tendenz, etwa die Norm zu überschreiten; im Gegenteil, die Werte halten sich etwas unter dem Durchschnitte

derjenigen vor dem Eingriff. Das Knochenmark ist also durch den Ausfall stark gehemmt, und das tritt auch im weißen Blutbilde zutage. Wohl tritt anfangs die übliche Lymphocytose ein, sie schlägt aber dann keineswegs etwa in eine Leukocytose um. Nach der anfänglichen Vermehrung der absoluten Zahl der weißen Blutkörperchen sinken die Werte auf die Norm herab und halten sich dabei während der ganzen Erholungszeit. In beiden vorausgegangenen Versuchen blieb sie während derselben erhöht.

Tabelle XLIV.
Versuchstier 13.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
18. März	53,9	35,9	5,1	1,8	3,3
21. "	52,8	38,4	4,3	2,0	2,5
Injektion von 1,9 ccm Lösung:					
22. März	67,1	26,3	3,1	2,1	2,4
24. "	59,4	31,5	5,2	1,3	4,6
29. "	62,5	30,3	3,8	1,1	2,3
4. April	58,0	35,5	2,3	1,2	2,0
6. "	60,3	34,0	3,2	1,3	2,2
8. "	62,5	32,2	3,0	1,1	1,2
11. "	60,5	32,3	3,2	1,3	1,7
15. "	58,3	35,8	3,1	1,7	1,1
17. "	57,1	35,1	3,8	1,8	2,2

Tabelle XLV.

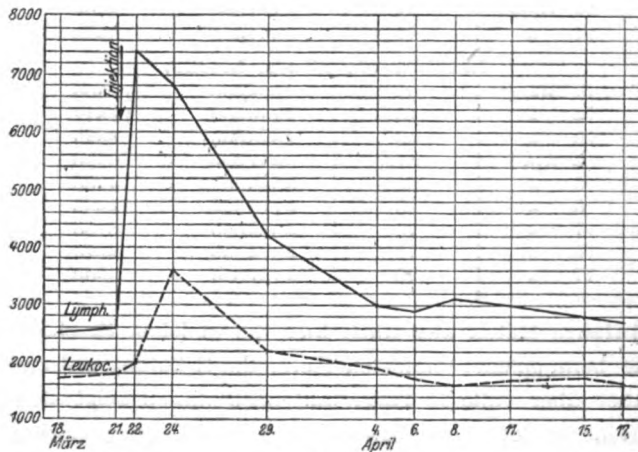


Fig. 14.

Sie bleibt sogar während der Beobachtungsdauer. Die Knochenmarkszellen treten zurück, uns in diesem Falle anzeigend, daß die Tätigkeit der Blutbildung gehemmt ist.

Das sollte durch die Untersuchung eines doppeloperierten Tieres bestätigt werden.

Tabelle XLVI.

Versuchstier 14.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
14. Mai	69	4 612 000	4200
Injektion von 1,8 ccm Lösung:			
17. Mai	24	1 380 000	10200
20. "	40	2 008 000	8925
23. "	50	3 043 000	8400
26. "	63	3 984 000	6800
28. "	71	4 361 000	5200
30. "	69	4 455 005	4725

Tabelle XLVII.

Versuchstier 14.

Datum	Lymphocyten	Poly-morphk. Leukocyt.	Übergangsformen	Gr. Mononukleäre	Basophile
14. Mai	39,3	51,5	3,1	3,3	2,8
Injektion von 1,8 ccm Lösung:					
17. Mai	55,2	38,2	3,4	2,0	1,2
20. "	39,4	51,2	5,1	1,2	3,1
23. "	31,1	61,0	3,5	1,8	2,6
26. "	39,2	53,6	2,1	2,6	3,1
28. "	43,2	49,3	4,0	1,3	2,2
30. "	47,2	44,0	3,8	2,1	2,9

Fehlt einem Kaninchen neben der Schilddrüse auch noch die Milz, so erholt es sich wieder schneller von der Anämie. Hier brauchte es 14 Tage, zufällig genau gleichviel wie das untersuchte Kontrolltier.

Auch bei den Leukocyten tritt die Knochenmarksreaktion wieder deutlich hervor, erstens in einer Vermehrung der Zahl, zweitens in einer Vermehrung der polymorphkernigen während der Rekonvaleszenz. Unsere bis dahin entwickelten Anschauungen erhalten dadurch einen Anhaltspunkt mehr.

Tabelle XLVIII.

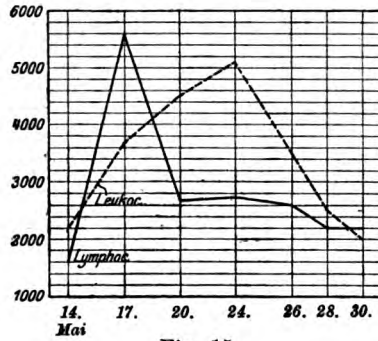


Fig. 15.

Zur besseren Übersicht stelle ich noch die Hämoglobinverhältnisse dieser Untersuchungen zusammen:

Tabelle II.

Hämoglobin.

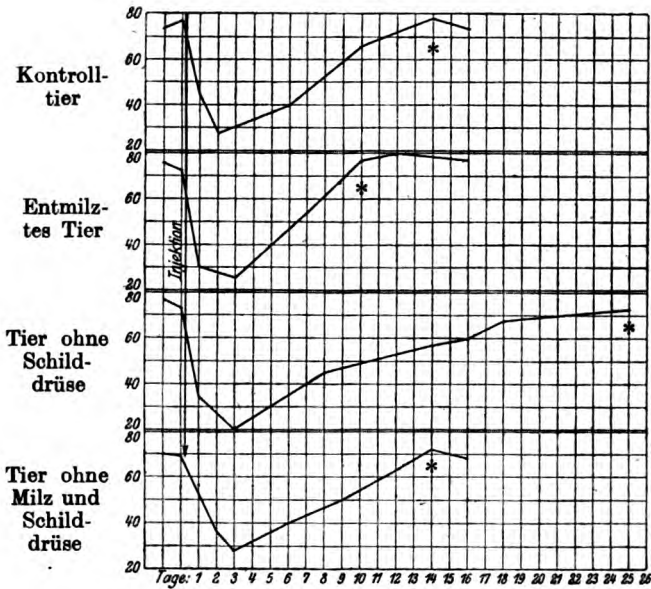


Fig. 16.

Die Resultate dieser 3. Versuchsreihe sind kurz die folgenden:

1. Werden Tiere anämisch gemacht, so erholen sie sich nach einer bestimmten kurzen Zeit wieder.

2. Die Erholungszeit ist bei milzlosen Tieren kürzer als bei unversehrten und führt zu einer Überproduktion.

3. Das Fehlen der Schilddrüse bedingt im Gegenteil eine viel längere Erholungszeit, dabei wird die Norm nicht vollständig wieder erreicht.

4. Fehlen einem Kaninchen beide Organe, so gestalten sich die Verhältnisse wieder wie beim Normaltiere.

5. Bei allen Tieren, außer bei den schilddrüsenlosen, dokumentiert sich die größere Knochenmarkstätigkeit auch in einer Vermehrung der weißen Knochenmarkszellen. Ohne Schilddrüse ist also das Knochenmark gehemmt.

6. Diese Befunde gestatten uns wieder, Milz und Schilddrüse in bezug auf die Blutbildung in einen gewissen Antagonismus zu bringen.

Werfen wir am Schlusse dieser Arbeit einen kurzen Blick auf die in der Einleitung umrissenen Ausgangspunkte zurück, so sehen wir, daß die vorliegenden Resultate sich leicht in das bisher Bekannte einfügen lassen. Ich will dieses der Kürze halber nicht noch einmal anführen. Der dort ausgesprochene Satz, daß bei Organen, wie Milz und Schilddrüse, die ihre Aufgaben erst durch andere Organe zum Ausdruck bringen, weckmäßig kombiniert untersucht werden sollen, hat sich bestätigt.

Ergebnisse.

In Kürze zusammengefaßt lauten die Resultate dieser Arbeit:

1. Die Milzexstirpation führt bei eisenreich ernährten Kaninchen zu einer vorübergehenden Erhöhung des Hämoglobins und der Erythrocytenzahl. Neben der hämolytischen Komponente, die dabei wegfällt, muß ein direkter Reiz auf das Knochenmark angenommen werden, da dieses dauernd unreife Formen roter Blutkörperchen an die Zirkulation abgibt.

2. Die Operation verändert die Zahl der weißen Blutkörperchen nicht, dagegen verursacht sie zunächst eine Abnahme der Lymphocytenzahl, mit einer entsprechenden Zunahme der Knochenmarkselemente. Die Erscheinung wird als Schädigung des lymphatischen Apparates und unter Zuhilfe-

nahme weiterer Differenzierung der Leukocyten als Reizung des leukopoetischen Systems gedeutet. Mit der Zeit entwickelt sich eine Lymphocytose, der Vorgang wird als Hyperkompensation aufgefaßt.

3. Während der Reiz des Sauerstoffmangels sich bei einem normalen Tiere durch eine kurzdauernde Abnahme von Erythrocyten und Hämoglobin dokumentiert, ist beim milzlosen Tiere der Sturz geringer und führt zu einer Regeneration über die Norm hinaus, wiederum im Gegensatze zum intakten Tiere.

4. Die Erholungszeit nach Anämien ist bei splenektomierten Tieren kürzer als bei unversehrten, sie führt im Gegensatz zu diesen zu einer Überproduktion.

5. Die Entfernung der Schilddrüse bewirkt eine sehr geringe Abnahme der Erythrocytenzahl, während das Hämoglobin auf gleicher Höhe bleibt. Das deutet auf eine, wenn auch nicht manifeste, so doch latente Hemmung des erythroblastischen Systems hin. Die Operation ruft eine sofort einsetzende relative Lymphocytose hervor.

6. Die Reizung durch Sauerstoffmangel (Injektion von Cyanwasserstoff) bewirkt beim schilddrüsenlosen Tiere keine Veränderung im Blutbilde, auch wenn doppelte Dosen verabreicht werden. Es kann dies aus einer mangelhaften Reaktionsfähigkeit der blutbildenden Apparate erklärt werden.

7. Fehlen der Schilddrüse bedingt bei Anämie eine viel längere Erholungszeit, als wenn diese vorhanden ist.

8. Werden einem Kaninchen zugleich Milz und Schilddrüse entfernt, so entsteht eine geringe Abnahme des Hämoglobins, eine verhältnismäßig bedeutendere der Erythrocyten. Diese Erscheinung tritt nicht ein, wenn die Schilddrüse an einem früher entmilzten Tiere weggenommen wird.

9. Bei einem derartig leicht anämischen Tiere besteht aber der durch die Splenektomie bedingte Reiz auf das Knochenmark fort, denn auch hier gibt dieses unreife Formen an das Blut ab. Wahrscheinlich trifft dieser Reiz auf ein durch die Wegnahme der Schilddrüse in seiner Tätigkeit gehemmt System. Daß das bei getrennter Operation nicht eintritt, beruht auf Kompensationsvorgängen.

Auch die Zahl der weißen Blutzellen sinkt durch die Operation.

10. Das morphologische weiße Blutbild verhält sich wie bei der Splenektomie, die Hemmung durch den Wegfall der Schilddrüse läßt einen stabilen Zustand aber erst nach längerer Zeit eintreten.

11. Die Wirkung der experimentellen Dyspnoë tritt wieder ein, wenn neben der Schilddrüse auch die Milz entfernt wird.

12. Der kurzdauernde Sauerstoffmangel verändert das weiße Blutbild bei allen Tieren, mit Ausnahme des schilddrüsenlosen, im Sinne einer Lymphocytose.

13. Die Erholung nach Anämie gestaltet sich bei einem doppeltoperierten Tiere wie bei einem normalen.

14. Die Anämie bewirkt während der Erholungszeit bei allen Tieren, mit Ausnahme des schilddrüsenlosen, als Ausdruck einer gesteigerten Knochenmarksfunktion, eine Vermehrung der weißen Knochenmarkszellen. Hier ist also auch wieder ohne Schilddrüse das Knochenmark gehemmt.

15. Diese Befunde gestatten es, natürlich unter der Reserve, daß über den Mechanismus nichts präjudiziert wird, von einem Antagonismus zwischen Milz und Schilddrüse in bezug auf die Blutbildung zu sprechen. Dabei arbeitet die Schilddrüse im Sinne einer Erregung, die Milz im Sinne einer Hemmung. Das Zusammenwirken beider reguliert die normale Funktion der blutbildenden Apparate. Es soll aber damit nicht ausgeschlossen sein, daß auch noch andere Blutdrüsen eine Rolle spielen.

Literatur.

- Asher u. Vogel: Diese Zeitschr. **43**, 386.
Asher u. Sollberger: Diese Zeitschr. **55**, 13.
Asher u. Ebnöther: Diese Zeitschr. **72**, 416.
Hirschfeld u. Klemperer: Berl. klin. Wochenschr. **22**, 1914.
Mansfeld u. Müller: Arch. f. d. ges. Physiol. **143**, 157, 1913.
Mansfeld: Arch. f. d. ges. Physiol. **152**, 32, 1913.
Ollino: Acc. Med. Genova Feber 1912.
Neuschloß: Arch. f. d. ges. Physiol. **161**, 492, 1915.
Regling u. Klunker: Deutsche milit.-ärztl. Zeitschr. **1911**, Heft 13.
Bayer: Mitt. aus den Grenzgeb. **21**, 338; **22**, 11 u. 532.
Pugliese: Arch. per le scienze medic. **24**.
Pugliese: Arch. italien. de biologie **33**, 1900.
Decastelle: Deutsche med. Wochenschr. **1914**.
Naegeli: Blutkrankheiten.
Kocher: Nach einer klinischen Vorlesung.
Sahli: Klinische Untersuchungsmethoden **1914**.
-

Untersuchungen über die Permeabilität der Zellen. .

VII.

Untersuchungen über die Resorption des Eiweißes und einiger seiner Abbauprodukte in der Bauchhöhle des Kaninchens.

Von

Marcus Kjöllnerfeldt.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 1. April 1917.)

Seitdem der Stand unserer Kenntnisse vom Aufbau des Eiweißes und von dem Abbau desselben im Verlaufe der Verdauung ein so weit gesicherter geworden ist, daß die chemische Bedeutung der Aminosäuren im Vordergrund des Interesses steht, gewinnt natürlich der Anteil der Aminosäuren an den physiologischen Vorgängen im Organismus eine erhöhte Bedeutung. Dies um so mehr, als jetzt nicht allein das tatsächliche Vorkommen von Aminosäuren im Darne die Möglichkeit des Aufbaues von Eiweiß aus Aminosäuren bei Fütterung mit denselben per os nachgewiesen worden ist, sondern auch einwandfrei, insbesondere durch die schöne physiologische Diffusionsmethode von Abel das Vorhandensein von Aminosäuren im Blutplasma, erwiesen worden ist. Unter den vielen Problemen, welche sich auf Grund dieses Sachverhaltes der Erforschung als bedürftig darbieten, befindet sich die Frage nach der Permeabilität der Capillarwände und der spezifischen Zellen für Aminosäuren. Es erheben sich eine Reihe von Fragen, so diejenigen, ob die Gefäßwände besonders leicht für Aminosäuren permeabel seien; sodann diejenige, ob etwa die verschiedenen spezifischen Zellen eine selektive Permeabilität für einzelne Aminosäuren besitzen. Man könnte geneigt sein, eine derartige selektive Permeabilität zu postulieren, wenn man sich

auf den Standpunkt der Lehre stellt, daß jede einzelne Zelle ihr spezifisches Zelleiweiß dadurch aufbaut, daß sie die hierzu notwendigen Aminosäuren dem Blute entnimmt.

Die Erörterung dieser und ähnlicher Fragen ist nicht dadurch gefördert worden, daß hinsichtlich der Permeabilität der Zellen für Aminosäuren die Lehre von der sehr engen Beziehung zwischen Permeabilität und hypothetischer lipoider Plasmamembran der Zellen sehr weite Verbreitung gefunden hatte. Für die Möglichkeit des Eindringens in die eigentlichen physiologischen Verhältnisse, welche etwa obliegen, muß ganz und gar von dieser ganzen Vorstellung abstrahiert werden. Es gibt aber neuere physiologische Erfahrungen, welche es nahe legen, die Frage nach der Permeabilität der Capillarwände für Aminosäuren in Angriff zu nehmen. Diese sind gegeben in einer Arbeit von Messerli aus dem Berner Institute. Messerli untersucht die Resorptionsgeschwindigkeit von nativem Eiweiß und von Eiweißabbauprodukten.

Die am meisten ins Auge springende Tatsache bei Messerlis Versuchen ist, daß von den Spaltprodukten des Eiweißes die höheren rascher resorbiert wurden, als die weiter abgebauten. So wurde Pepton gleich schnell wie Erepton, aber noch rascher als total hydrolysiertes Casein resorbiert. Diese Befunde stimmen im wesentlichen mit denen von Nolf und seinen Mitarbeitern überein, im Gegensatz zu denen von Kutscher, Abderhalden, Zunz und anderen. Darum glaubt Messerli auch aus seinen Versuchen entgegen der Ansicht der letzteren annehmen zu dürfen, „daß physiologischerweise im Darm nicht alles Eiweiß bis zu den letzten Bausteinen aufgespalten und daraus indifferentes Bluteiweiß synthetisiert wird, sondern daß eine ergiebige Menge von Nahrungsstickstoff schon in Form höherer Stufen, wie Albumosen und Peptone, durch das Darmepithel resorbiert wird“.

Die Resorptionsdauer bei Messerlis Versuchen war 18 bis 47 Minuten, aber die Resorptionsgeschwindigkeit wurde für sämtliche Versuche für 10 Minuten ausgerechnet.

Die mittlere Resorption in mg und in 10 Minuten war:

für Serum	20,17 ‰
„ Casein	12,73 „
„ Pepton	26,60 „

für Erepton 27,46 %

„ hydrolysiertes Casein. 22,08 „

Der Überblick über diese Zahlen lehrt, daß kaum ein merklicher Unterschied in der Resorptionsgeschwindigkeit so kompliziert gebauter Körper wie der Albumosen und dem total abgebauten Erepton und dem Gemisch von Aminosäuren im noch weiter gespaltenen tief hydrolysierten Casein besteht. Messerli zieht aus diesen Beobachtungen den für die Verdauungslehre wichtigen Schluß, daß es nicht etwa im Interesse der erleichterten Resorption benötigt wird, daß die Eiweißkörper bis zu Aminosäuren herabgespalten werden. Messerlis Untersuchungen betrafen die Resorption vermittelt der spezifischen Darmepithelien, und es ist durchaus möglich, daß der geringe Unterschied zwischen der Resorptionsgeschwindigkeit von hohen und tiefen Spaltungsprodukten des Eiweißes auf den Eigenschaften der Darmepithelien beruht. Es ist klar, daß die Frage, wie sich die gleichen Produkte hinsichtlich der Leichtigkeit, mit welcher sie durch andere Zellwände, insbesondere diejenige der Capillaren, durchtreten, durch Untersuchungen der Darmresorption nicht beantwortet werden können, und ich folgte daher der Anregung von Prof. Asher, speziell die Permeabilität der Capillarwände vergleichend für Eiweiß und Eiweißabbauprodukte zu untersuchen und diese Untersuchungen an einer Prädilektionsstelle für derartige Ziele, nämlich an der Peritonealhöhle, durchzuführen. Die Resorption in der Peritonealhöhle ist in neuerer Zeit sehr vielfach untersucht worden, namentlich in der Absicht, um Aufschluß über die bei der Resorption in Betracht kommenden Triebkräfte zu erhalten. Ich brauche nur an die Arbeiten von Heidenhain, Orlow, Starling und Mitarbeiter, Hamburger, Cohnheim, Asher und andere zu erinnern. Eine besondere Stellung unter diesen Arbeiten nimmt diejenige von W. Roth ein, weil sie eine für derartige Untersuchungen besonders brauchbare und zuverlässige Methodik geschaffen hat.

Es ist an dieser Stelle nicht erforderlich, auf die Ergebnisse dieser Arbeiten einzugehen, weil meine Fragestellung eine andere ist als diejenige, welche in den genannten Arbeiten die Hauptrolle spielt. Denn in meiner Arbeit steht die Frage nach den Triebkräften nicht zur Diskussion. Nur ein Punkt möge

berührt werden: die Untersuchungen in der Peritonealhöhle werden mit der Absicht angestellt, Aufschluß über die Resorption durch die Capillarwände zu erhalten. Aber wie Asher besonders betont hat, haben wir es in der Peritonealhöhle nicht allein mit den Zellen der Capillaren, sondern auch mit den Endothelzellen zu tun. Aber auch dieser Tatbestand ist der speziellen Aufgabe, mit der ich mich zu befassen habe, nicht hinderlich. Denn gleichgültig, wie groß oder wie klein der Anteil der Zellen der Peritonealhöhle sein mag, den wesentlichsten Anteil an der Resorption nehmen die nicht zu umgehenden Capillarwände.

Hingegen will ich an dieser Stelle auf einen wesentlichen Teil der Rothschen Methodik eingehen, weil ich diese Methode in meiner eigenen Arbeit benutzt habe.

Roths Methodik bei seinen Resorptionsversuchen in der Bauchhöhle unterscheidet sich von der früherer und auch späterer Autoren dadurch, daß er sich nicht begnügte, nur die Flüssigkeit quantitativ und qualitativ zu bestimmen, die aus der Bauchhöhle abgelassen werden konnte, sondern er bestimmte noch den Rest, d. h. die nach der ersten Prozedur zurückgebliebene Flüssigkeit. Dabei verfuhr er so, daß er nach der erwünschten Versuchsdauer die aus der Bauchhöhle wieder erreichbare Flüssigkeit abließ und die Konzentration in Prozent dieser, Portion I, bestimmte. Hierauf infundierte er in die Bauchhöhle eine körperwarmer bekannte Menge isotonischer Kochsalz-, Traubensalz- oder Na_2SO_4 -Lösung, wusch die Bauchhöhle durch kräftiges Schütteln aus und ließ die zur Auswaschung dienende Lösung sofort ab. Nachdem er nun auch hier in Portion II die Konzentrationen an ursprünglichen Lösungsbestandteilen in Prozenten bestimmt hatte, konnte er den Rest nach der Formel

$$R = \frac{M \times U_2 \text{ Prozent}}{U_1 - U_2 \text{ Prozent}}$$

berechnen.

M ist die zur Auswaschung dienende Flüssigkeitsmenge, U_1 die Konzentration der Portion I an den ursprünglichen Lösungsbestandteilen in Prozenten, U_2 die Konzentration von Portion II in Prozent, auch in bezug auf die ursprünglichen Lösungsbestandteile berechnet. Durch Kontrolle an dem sofort

nach dem Experiment getöteten Tier stellte Roth fest, daß die Auswaschmethode bis auf 2 ccm genaue Resultate gab. Roth verwendete dasselbe Versuchstier mehreremal hintereinander und schaltete nur eine Pause von $\frac{1}{2}$ bis $1\frac{1}{2}$ Stunde zwischen den einzelnen Versuchen ein.

Zum Schlusse der Einleitung sei zusammenfassend hervor-gehoben, daß Eiweißkörper und Eiweißabbauprodukte in die Peritonealhöhle gebracht werden sollten und aus der Veränderung in der Zusammensetzung der eingebrachten Flüssigkeit ein Rückschluß auf die Resorption durch die Capillarwände gemacht werden sollte. Auf diese Weise hoffte ich insbesondere einen Aufschluß darüber zu erhalten, wie es sich mit der Permeabilität der Capillarwände speziell gegenüber Aminosäuren verhielte. Die Änderung in der Zusammensetzung beurteilte ich unter Anwendung der Rothschen Methodik durch Bestimmung des Gesamtstickstoffes und des formoltitierbaren Stickstoffs nach Sörensen.

Spezieller Teil.

1. Material und Methoden.

Zur Untersuchung auf ihre Resorptionsgeschwindigkeit in der Bauchhöhle kamen nachfolgende Eiweißkörper und Abbauprodukte des Eiweißes:

1. Zentrifugierte Milch.
2. Casein aus dem hiesigen Institut, nach Hammarsten dargestellt.
3. Peptonum siccum (Witte, Rostock).
4. Pepton e carne (Merck).
5. Hydrolysiertes Casein, tyrosinfrei, von der Firma Hoffmann-La Roche & Co., Basel.
6. α -Alanin „Kahlbaum“.
7. Glutaminsäure von C. F. Kahlbaum, Berlin.
8. Glykokoll " " " " "
9. Asparaginsäure " " " " "

Diese Substanzen (die Milch ausgenommen) wurden in der Mehrzahl der Fälle in einer 1⁰/₁₀igen NaCl-Lösung gelöst und die Mischung, wo es ausführbar war, neutral oder amphoter gemacht. In den Fällen, wo Magermilch oder Milchserum als

Lösungsmittel zur Anwendung kam, geschah es in der Absicht, den Reiz der Lösungsbestandteile auf die Serosa der Bauchhöhle herabzusetzen und die hierdurch eventuell beeinflusste Resorptionsgeschwindigkeit zu studieren. Die Caseinlösung war mit einer 10⁰/₀igen Sodalösung schwach alkalisch gemacht. Die Injektionsflüssigkeit war ebenfalls in der Mehrzahl der Fälle (in bezug auf die Versuchssubstanz) 2⁰/₀ig. Es wurde immer 1 g Substanz einverleibt. Die Lösung, durch Erwärmen möglichst steril gemacht, wurde körperwarm in die Bauchhöhle infundiert. Die näheren Angaben über die Injektionsflüssigkeit sind im Protokoll bei den einzelnen Versuchen verzeichnet. Die NaCl-Lösung wurde hyperisotonisch und 1⁰/₀ig gewählt, um die Wasserresorption möglichst klein zu halten und die Entnahme größerer Bauchflüssigkeitsmengen für die chemische Analyse zu erleichtern.

Als Versuchstier diente das Kaninchen, weil dasselbe in der gewünschten Größe und Anzahl leicht zu beschaffen war. Allerdings ist sein mächtig entwickelter und stets gefüllter Intestinaltraktus für das Gelingen des Einstichs und die freie Beweglichkeit der Nadel von Nachteil. Doch kann dieser Nachteil durch die Wahl junger Tiere im Gewichte von 1200 bis 1500 g und einer passenden Technik mit Assistenz bei dem Einstich und besonders bei der Entnahme der Bauchhöhlenflüssigkeit vermindert werden. Ein vorangegangener Hungertag hat keinen Einfluß auf die Füllung der Gedärme. Bei der Einverleibung der Versuchsflüssigkeit wurde das Kaninchen von einem Gehilfen an den Beinen mäßig gestreckt, in Kopfhängelage gehalten und eine Spritzennadel, nach vorangegangener Scherung der Haare der Einstichstelle, in die linke Flanke eingestochen. Der Einstich wird am vorteilhaftesten nah an der Wirbelsäule im spitzen Winkel ausgeführt und die Nadelrichtung anal-oval-ventral gegen die Mittellinie gewählt.

Nun wird eine Kanüle, die durch einen Gummischlauch mit Klemme an einer graduierten Bürette verbunden ist, in die Nadel eingeführt. Die Kanüle, der Nadel genau angepaßt, soll die Nadelspitze etwas überragen. Hierdurch ist man vor Verletzungen der Eingeweide sicher und kann jetzt die Nadel inkl. Kanüle tiefer führen und eine passende Stelle für die Infusion zwischen den Gedärmen aufsuchen. Die mit der Injektions-

flüssigkeit gefüllte und an einem Stativ befestigte Bürette kam auf einem Tisch neben dem Tiere zu stehen. Das Tier war tiefer wie die Tischplatte gelagert. Durch Öffnen der Klemme konnte nun die gewünschte Flüssigkeitsmenge (50 ccm oder 100 ccm) unter Selbstdruck aus der Bürette durch den Schlauch und die Kanüle in die Bauchhöhle einfließen.

Nach beendigter Infusion wurde die Zeit notiert, und nach Herausnahme der Nadel konnte das Tier sich während der Versuchsdauer (30 oder 60 Minuten) frei bewegen. Die Infusion von 50 ccm nahm ca. 3 Minuten in Anspruch.

Bei der Entnahme der in der Bauchhöhle noch vorhandenen Flüssigkeit verfuhr ich folgendermaßen. Das Tier wurde wieder von einem Gehilfen in Kopfhängelage gehalten. Aber jetzt führte ich meine Nadel nicht in die Flanke, sondern an der Grenze des mittleren und hinteren Drittels dicht an der Linea alba, in die Bauchhöhle anal-oval gerichtet im spitzen Winkel ein. An dieser Stelle waren die Haare selbstverständlich auch vorher glatt abgeschnitten. Hierauf brachte der Gehilfe, selber sitzend, das Tier in Rückenlage auf seine Kniee. In dieser Lage wurde die mit dem Schlauch verbundene Kanüle in die Nadel eingeführt, die Nadel mit der Kanüle jetzt analwärts gerichtet, der Innenseite der Bauchdecke entlang tiefer geführt und von außen mit der einen Hand so fixiert.

Nachdem das freie Ende des Gummischlauchs durch den Hals eines großen, fixierten Glastrichters, der in einen auf dem Boden stehenden Meßzylinder hineinragte, geleitet war, wurde das Tier nun in die Bauchlage auf den gespreizten Knien des sitzenden Gehilfen umgekippt, worauf die noch vorhandene Bauchflüssigkeit gewöhnlich spontan oder nach einigen kleinen Bewegungen der Nadel in das Meßglas durch den Gummischlauch abtröpfelte.

Um jetzt möglichst viel Flüssigkeit aus der Bauchhöhle zu gewinnen, wurde das Tier in der Bauchlage mit dem Vorderteil höher gelagert und die Bauchdecke mit der andern noch freien Hand gehoben und sanft in die Richtung nach hinten gepreßt, um hierdurch die gesamte Flüssigkeit an die Kanüle heranzubringen. Da das Tier über den Glastrichter gehalten wurde, ging hierdurch kein neben der Nadel heraussickernder Tropfen verloren.

Die Entnahme nahm verschieden lange Zeit in Anspruch, doch war sie durchschnittlich binnen 15 Minuten beendet. Die erste gewonnene Flüssigkeit nenne ich Portion A.

Unmittelbar nach der Entnahme wurde die Bauchhöhle mit einer bestimmten Menge, gewöhnlich 50 ccm, 1⁰/₀iger NaCl-Lösung gewaschen, um durch Bestimmung des Stickstoffes des Waschwassers die nach der ersten Entnahme noch vorhandenen Lösungsbestandteile zu berechnen. Das Waschwasser führte ich in ähnlicher Weise, wie bei jeder Infusion, durch die Flanke in die Bauchhöhle ein.

Nachdem wieder die Nadel aus der Flanke entfernt war, wurde das Tier aus der Kopfhängelage in die Rückenlage auf den Schoß des Gehilfen gebracht und der Bauchinhalt kräftig massiert, worauf die Entnahme des Waschwassers folgte. Dies geschah ähnlich wie für die Entnahme der Injektionsflüssigkeit schon beschrieben worden ist. Das zurückgewonnene Waschwasser nenne ich Portion B.

Ich möchte noch hinzufügen, daß die Tiere diese Manipulationen gut vertrugen und daß ich kein einziges Tier an Peritonitis verlor, obgleich nur die Nadel und die Kanüle durch Kochen, die Flüssigkeiten durch längeres Erwärmen auf 85⁰ (Milch) oder Kochen sterilisiert wurden. Die Kaninchen wurden nach einer Zwischenzeit von einer Woche mehrmals so behandelt und ein Kaninchen sogar siebenmal.

Die beiden aus der Bauchhöhle gewonnenen Portionen A und B in Kubikzentimeter wurden enteiweißt, wenn nicht die Resorptionsgeschwindigkeit höherer Eiweißkörper bestimmt werden sollten. Bei sämtlichen Resorptionsversuchen mit Peptonen, hydrolysiertem Casein und Aminosäuren wurde daher die Enteiweißung ausgeführt, denn die Bauchflüssigkeit war immer, aber in wechselnden Mengen, mit Transsudaten bereichert.

Aus dieser Ursache fand ich es auch zwecklos, weitere Resorptionsversuche mit Milch und Casein auszuführen.

Die Fällung des Eiweißes geschah in einer Porzellanschale durch Kochen unter vorsichtigem, tropfenweisem Zusatz von 2⁰/₀iger Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion. Um sicher zu sein, daß die Fällung des Eiweißes vollständig war, wurde das Filtrat mit 20⁰/₀iger Sulfosalicylsäure auf Eiweiß geprüft. Entstand dabei auch nur die schwächste Trübung,

wurde die Flüssigkeit nochmals gekocht usw., die ganze Prozedur wiederholt. Der Inhalt in der Porzellanschale kam dann quantitativ auf ein Filter, der Eiweißniederschlag und das Filter wurden mehrmals gewaschen und das Filtrat auf ein gewünschtes Volumen in Kubikzentimeter gebracht.

Hierauf folgten die Analysen auf den Gesamtstickstoff und den formoltitrierbaren Stickstoff. Von der Injektionsflüssigkeit und von den Portionen A und B sind immer Doppelanalysen ausgeführt worden. Wenn die Differenz unter den beiden Analysen groß war, was ausnahmsweise eintraf, führte ich noch eine dritte Kontrollanalyse aus und verwertete den Mittelwert von zwei sich am nächsten übereinstimmenden.

Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs geschah nach Kjeldahl. Im Anfang meiner Versuche brachte ich, wie üblich, nur 5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit in die Kjeldahl-Kolben. Die darin enthaltenen Stickstoffmengen waren aber sehr klein, wodurch die unvermeidlichen Analysenfehler per 100 ccm ausgerechnet zu fühlbar wurden. Daher verwendete ich später 20 ccm Flüssigkeit für die Analyse. Hierdurch verringerte ich den Fehler um das Vierfache. Die Verbrennung ging auch glatt vonstatten unter Zusatz von 5 g Kaliumsulfat, ein bis zwei Körnchen Kupfersulfat und 10 ccm konzentrierter, chemisch reiner Schwefelsäure. Der Kolbeninhalt nach der Verbrennung, klar und grünlich aussehend, wurde mit 200 ccm ausgekochtem destilliertem Wasser verdünnt. Nachdem die nötige Menge Talkum zugesetzt worden war, machte ich den Kolbeninhalt mit 70 ccm einer 50⁰/₁₀igen Kaliumhydroxydlösung alkalisch und destillierte den Stickstoff in einem Kjeldahl-Apparat als Ammoniak in eine Vorlage mit einer hinreichenden Menge $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure über. Die überschüssige Schwefelsäure wurde mit einer $\frac{n}{10}$ -NaOH-Lösung mit einigen Tropfen Cochenilletinktur als Indicator zurücktitriert. Die verbrauchte $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure in Kubikzentimeter wurde mit 1,4 multipliziert. Das Produkt gibt den vorhandenen Gesamtstickstoff in Milligramm an. Diese Analysenwerte sind als Mittelwerte zweier Analysen in den Tabellen in den Kolonnen mit dem Kopfbuchstaben N_G eingetragen. Hinzufügen möchte ich noch an dieser Stelle, daß sämtliche Reagenzien sowie das destillierte Wasser auf ihren Stickstoffgehalt fortlaufend geprüft wurden

und daß die hierdurch bedingte Korrektur der Analysenwerte stattfand.

Die Bestimmung der formoltitrierbaren Aminosäuren geschah vermittels der Formoltitration nach Sørensen. Seine Methode wurde, so wie sie im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 6, 262, 1912 von Jessen-Hansen beschrieben ist, genau befolgt. Die Neutralisation der Flüssigkeiten wurde gegen ein Azolithminpapier von Merck ausgeführt. Die Kontrolle des Papiers mit einer Phosphatlösung nach Sørensen konnte ich nicht ausführen, weil die hierzu nötigen Phosphate nicht chemisch rein zu haben waren. Die mit dieser Methode enthaltenen Stickstoffwerte werden kurz Formol-N genannt und haben als Mittelwerte in den Kolonnen der Tabellen den Kopfbuchstaben N_F . An dieser Stelle wäre noch die Methode, die für die Phosphorbestimmung bei zwei Resorptionsversuchen mit Casein zur Anwendung kam, zu erwähnen.

Es hatte sich nämlich gezeigt, daß die Resorptionsverhältnisse in der Bauchhöhle bei Eiweißkörpern, wie sie in der Milch und in dem Casein vorhanden sind, sich nicht klar überblicken lassen. Sie werden von den mehr oder weniger reichlichen Transsudaten, die bei den Versuchen auftreten, verdeckt. Nun wird aber die Bindung des Phosphors an dem Eiweiß des Caseins als konstant betrachtet, und darum fragt es sich, ob nicht die Resorptionsgeschwindigkeit des Caseins indirekt durch die Bestimmung des resorbierten Phosphors sich berechnen ließe.

Auf Anregung des Herrn Professor Asher führte ich deshalb den Versuch aus.

Auch auf seine Veranlassung versuchte ich, erst den Phosphor nach dem von Mandel und Neuberger inaugurierten Verfahren, das darin besteht, daß die organische Substanz anstatt wie üblich bei der Phosphorbestimmung durch eine Schmelze, durch H_2O_2 in Gegenwart von Eisennitrat als Katalysator zerstört wird, zu bestimmen. Ich nahm aber davon wieder Abstand, da die Zerstörung der organischen Substanz durch H_2O_2 in meinem Falle zu langwierig und kostspielig und der Katalysator später bei der Fällung des Phosphats natürlich hinderlich gewesen wäre.

Ich griff deshalb zu dem alten Verfahren für die Phosphorbestimmung und führte diese gleichzeitig gravimetrisch

nach Salkowski und titrimetrisch nach Hebebrandt aus. Aber auch nach diesen beiden Methoden war das Resultat hier nicht zufriedenstellend.

Daß dieser Versuch dessenungeachtet doch Aufnahme gefunden hat, kommt von meinem Wunsche, zu zeigen, daß nach meiner Ansicht Phosphorbestimmungen unter den Verhältnissen, wie sie hier vorliegen, nicht ausführbar sind. Denn um möglichst physiologisch zu arbeiten, kann ich nur eine Caseinlösung von geringer Konzentration anwenden. Und da das Casein selbst nicht mehr wie 0,87% Phosphor enthält, bin ich gezwungen mit Phosphormengen zu arbeiten, die nur einige Milligramm und noch weniger betragen.

Die Gegenwart von Salzen vermehren noch die Schwierigkeiten. Ist doch die Anwesenheit z. B. von Chlorverbindungen bei der genauen Phosphorbestimmung von den Chemikern verpönt. Aber um eine dem Blutplasma isotonische und im übrigen indifferente Flüssigkeit zu haben, wollte ich nicht auf das Kochsalz verzichten. Und da das unvermeidliche Transsudat sowie das oftmals beigemengte Blut bei diesen Versuchen nicht absolut phosphorfrei sind, so entstand hierdurch eine Schwierigkeit, die ich bei der mir zur Verfügung stehenden Zeit nicht überwinden konnte.

2. Resorptionsversuche mit Milch und Casein.

Versuch 9. 9. II. 16.

Kaninchen 1800 g.

10 ^h 15	100 ccm	Magermilch	in die Bauchhöhle.	
10 ^h 45	16 „	Milch	aus der Bauchhöhle entleert.	
	Gesamt-N	der eingeführten Milch	in Proz.	0,5082
	„	„	wiedergewonnenen Milch	in Proz. 0,4788
	„	„	, absolute Menge, die eingeführt wurde 0,5082 g
	„	„	„	„ hinzukam 0,0462 g

Versuch 10. 9. II. 16.

Kaninchen 1950 g.

10 ^h 25	100 ccm	Magermilch	in die Bauchhöhle.
11 ^h 25	10 „	Milch	aus der Bauchhöhle.
	Gesamt-N	der eingeführten Milch	in Proz. 0,5082

Gesamt-N der wiedergewonnenen Milch in Proz. . .	0,4424
„ „ , absolute Menge, die eingeführt wurde . .	0,5082 g
„ „ „ „ resorbiert „ . .	0,1700 g

Versuch 22. 3. III. 16.

Kaninchen 1200 g (4 mal).

9^b15 50 ccm 2^o/_oige Caseinlösung in die Bauchhöhle.

9^b45 13 „ Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Gesamt-N der eingeführten Caseinlösung in Proz. . .	0,2632
„ „ „ wiedergewonnenen „ „ „ . .	0,4704
„ „ , absolute Menge, die eingeführt wurde . .	0,1316 g
„ „ „ „ „ „ hinzukam	0,0611 g

Obgleich es die Aufgabe dieser Arbeit war, die Resorptionsgeschwindigkeit mehrerer Eiweißkörper vergleichend zu untersuchen, habe ich es mit diesen drei Versuchen bewendet sein lassen. Denn diese Versuche, komplettiert mit zwei blinden Versuchen, zeigen unzweideutig, daß eine Transsudation nach Einführung einer Flüssigkeit in die Bauchhöhle stattfindet. Die Transsudate sind N-haltig, und ihr Stickstoff kann nicht von dem Stickstoff der Eiweißkörper der Milch des Serums usw. getrennt werden. Darum sind Resorptionsversuche mit diesen und ähnlichen Stoffen nach meiner Ansicht illusorisch. Wenn es auch denkbar wäre, die Zusammensetzung der Flüssigkeit so zu wählen, daß kein chemischer Reiz auf die Serosa ausgeübt werden könnte, so bleibt noch immer der unvermeidbare mechanische Reiz, der Einstich und die übrigen Manipulationen an der Bauchhöhle bestehen. Daher kommen auch die regellosen Resorptionswerte in diesen drei Versuchen. Bei der Milch im Versuch 9 hat keine Resorption stattgefunden, wohl aber eine Zunahme von 9^o/_o während 30 Minuten und im Versuch 10 wieder eine Resorption von 33^o/_o während 60 Minuten. Bei dem Versuch 23 mit einer 2^o/_oigen Caseinlösung war ebenfalls eine Zunahme von sogar 61^o/_o zu verzeichnen.

Als Ursache dieser Regellosigkeit dürfte neben den individuellen Momenten nur die obenerwähnte Transsudation angenommen werden können.

Das Ergebnis ist in seiner Regellosigkeit analog mit dem, das andere Autoren, die Resorptionsversuche in der Bauchhöhle

mit Serum (Wegner, Orlow, Roth, Asher) und Milch (Asher) angestellt haben, zu verzeichnen hatten.

Aber keiner von diesen Autoren hat eine bestimmte Ursache für diese Regellosigkeit ihrer Resorptionswerte gefunden oder eine Vermutung dafür ausgesprochen.

Doch springt aber ein wesentlicher Unterschied zwischen den Resorptionsergebnissen jener Autoren und den meinigen ins Auge, der, vielleicht von der Methodik herrührend, der Besprechung bedarf. So konnten Orlow und Asher in ihren Resorptionsversuchen, die an Zahl die größten sind, stets eine stattgefundene Resorption feststellen, ich dagegen nicht, nach der Berechnungsweise nach Roth. Ziehe ich aber nur die Mengen an Stickstoff in der Portion A, d. h. in der wiedergewonnenen Milch oder in dem Casein in Betracht, so kann auch ich stets eine Resorption verzeichnen, wie aus der Generaltabelle zu entnehmen ist.

So sind von 0,5080 g N der Milch, die eingeführt wurden, sowohl im Versuch 9, wie im Versuch 10, 0,126 g N, wie bei dem Versuch 22 mit der Caseinlösung von eingeführten 0,131 g N, 0,103 g N in absoluten Mengen wiedergewonnen worden. Die entsprechenden eingeführten totalen Mengen Flüssigkeit sind immer größer wie die wiedergewonnenen, und die Konzentration hat doch in sämtlichen wiedergewonnenen Portionen abgenommen.

Wenn auch mit Recht angenommen wird, daß die Entleerung der Bauchhöhle mit einer Kanüle in der ersten Portion nicht als vollständig angesehen werden kann, so dürfte doch die Entleerung nach der Auswaschung als vollständig betrachtet werden können. Und doch ergibt sich bei der Berechnung, daß eine recht erheblich große Menge Lösungsbestandteile als Rest zurückgeblieben ist (siehe Generaltabelle).

Diese Erscheinung tritt besonders bei den Resorptionsversuchen mit Eiweißkörpern und den höheren Spaltprodukten des Eiweißes zutage. Hier wäre zur Erklärung nach meinem Dafürhalten der Begriff der Imbibition (Hamburger), wenn man sich nicht mit dem der Adsorption begnügt, am Platze.

Demnach würde diese Erscheinung in höchstem Maße bei den Eiweißkörpern auftreten und die Resorptionswerte von der Methodik dort am stärksten abhängig machen.

Diese Imbibition wäre dann auch nach meiner Ansicht der zweite Faktor, der neben der Transsudation, die Regellosigkeit der Werte bei den Resorptionsversuchen mit Milch, Serum, Casein usw. steigert.

Ihre Größe hänge dann von der Methodik bei der Wiedergewinnung der Bauchflüssigkeit und von der Geschwindigkeit, mit welcher der imbibierte Stoff zurückgewonnen wird, ab. Und darum ist es schließlich nur angängig, Resorptionswerte zu vergleichen, die mit derselben Methodik und mit demselben Stoff gewonnen sind.

Die Resorptionsversuche mit Serum von Hamburger waren nur auf die Bestimmung der Konzentrationsänderung in der Bauchhöhle gerichtet. Die Resorption des Stickstoffes wurde nicht berücksichtigt, darum werden sie an dieser Stelle nicht zum Vergleich benutzt.

Ich unterlasse es auch, die Resorptionswerte jener anderen Autoren hier näher anzuführen.

Daß die Transsudation nicht bei den Resorptionsversuchen im Darm auftritt oder beobachtet wird, beruht auf den dort herrschenden spezifischen Verhältnissen. Und darum kann der Darm in seiner physiologischen Funktion in dieser Gruppe von Resorptionsversuchen bei Anwesenheit von Transsudaten nicht zum Vergleich mit jener der Bauchhöhle herangezogen werden.

3. Resorptionsversuche mit Fleischpepton und Witte-Pepton.

Versuch 23. 6. III. 16.

Kaninchen 1700 g.

9 ^h 50	50 ccm	2 ^o / ₀ ige	Fleischpeptonlösung	in die			
				Bauchhöhle.			
10 ^h 20	62 "		Flüssigkeit	aus der	Bauchhöhle.		
Gesamt-N der eingeführten Fleischpeptonlösung in Proz.					0,2246		
"	"	"	wiedergewonnenen	"	"	0,0945	
"	"	"	, absolute Menge, die eingeführt wurde	.	0,1123 g		
"	"	"	"	"	resorbiert	"	. 0,0314 g

Versuch 24. 6. III. 16.

Kaninchen 1750 g.

9^h55 50 ccm 2^o/₀ige Fleischpeptonlösung in die
Bauchhöhle.

11^b10 14 ccm Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.
 Gesamt-N der eingeführten Fleischpeptonlösung in Proz. 0,2246
 " " " wiedergewonnenen " " " 0,0392
 " " , absolute Menge, die eingeführt wurde . . 0,1123 g
 " " " " " hinzukam 0,0106 g

Versuch 5. 25. I. 16.

Kaninchen 1800 g (2 mal).

3^b25 50 ccm 2^o/_oige Peptonlösung in Aqua destillata
 in die Bauchhöhle.
 4^b25 15 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.
 Gesamt-N der eingeführten Peptonlösung in Proz. . 0,2800
 " " " wiedergewonnenen " " " . 0,3136
 " " , absolute Menge, die eingeführt wurde . 0,1400 g
 " " " " " resorbiert " . 0,0442 g

Versuch 15. 21. II. 16.

Kaninchen 2050 g (4 mal).

10^b05 50 ccm 2^o/_oige Peptonlösung in 1^o/_oiger NaCl-
 Lösung in die Bauchhöhle.
 11^b05 40 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.
 Gesamt-N der eingeführten Peptonlösung in Proz. . 0,2747
 " " " wiedergewonnenen " " " . 0,1176
 " " , absolute Menge, die eingeführt wurde . 0,1372 g
 " " " " " resorbiert " . 0,0340 g

Versuch 16. 21. II. 16.

Kaninchen 1750 g.

10^b00 50 ccm 2^o/_oige Peptonlösung in 1^o/_oige NaCl-
 Lösung in die Bauchhöhle.
 3^b00 8 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.
 Gesamt-N der eingeführten Peptonlösung in Proz. . 0,2747
 " " " wiedergewonnenen " " " . 0,0504
 " " , absolute Menge, die eingeführt wurde . 0,1372 g
 " " " " " resorbiert " . 0,1063 g

Versuch 29. 22. III. 16.

Kaninchen 2050 g (7 mal).

9^b35 50 ccm 2^o/_oige Peptonlösung in Magermilch
 in die Bauchhöhle.

10^b05 42 ccm Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Gesamt-N der eingeführten Peptonlösung in Proz.	. 0,2660
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,1575
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,1330 g
" " " " " resorbiert "	. 0,0200 g

Versuch 30. 22. III. 16.

Kaninchen 1300 g.

9^b45 50 ccm 2⁰/₀ige Peptonlösung in Magermilch
in die Bauchhöhle.

10^b45 60 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Gesamt-N der eingeführten Peptonlösung in Proz.	. 0,2660
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,1533 g
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,1330 g
" " " " " resorbiert "	. 0,0008 g

Versuch 33. 28. III. 16.

Kaninchen 1750 g (4 mal),

2^b40 50 ccm 2⁰/₀ige Peptonlösung in Milchserum in
in die Bauchhöhle.

3^b10 43 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Gesamt-N der eingeführten Peptonlösung in Proz.	. 0,3276
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,2267
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,1638 g
" " " " " resorbiert "	. 0,0255 g

Versuch 34. 28. III. 16.

Kaninchen 1700 g (5 mal).

2^b45 50 ccm 2⁰/₀ige Peptonlösung in Milchserum in
die Bauchhöhle.

3^b45 45 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Gesamt-N der eingeführten Peptonlösung in Proz.	. 0,3276
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,1596
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,1638 g
" " " " " resorbiert "	. 0,0623 g

Die Gruppe der Peptonversuche, wie ich sie kurz nennen möchte, umfaßt acht Einzelversuche, davon sechs mit Witte-Pepton und zwei mit Fleischpepton. Das Pepton wurde in sämtlichen Versuchen in einer Konzentration von 2⁰/₀ von 1 g

absoluter Menge infundiert. Die Lösungsmittel waren destilliertes Wasser, 1^o/_oige NaCl-Lösung, Magermilch oder Milchserum. Die Resorptionsdauer betrug in drei Fällen 30 Minuten, in fünf Fällen 60 Minuten. Nur im Versuch 16 war die Versuchsdauer 5 Stunden. Die Resorptionswerte beziehen sich nur auf den Gesamtstickstoff. Denn der Formol-N war klein und machte bei einer genauen Bestimmung Schwierigkeiten und blieb aus dem Grunde unberücksichtigt. Die Resorptionswerte sind hier noch sehr schwankend, wie überhaupt bei den höheren Spaltprodukten des Eiweißes, doch ist die Ursache nicht ganz klar.

Greife ich hier erst die Versuche 23 und 24 mit Fleischpepton heraus, so hat in dem einen Versuch 23 eine Resorption stattgefunden, und zwar in 30 Minuten eine absolute Menge von 0,0314 g N, die 26^o/_o der eingeführten Menge ausmacht. Dabei übersteigt die wiedergewonnene Flüssigkeitsmenge (62 ccm) die eingeführte (50 ccm) mit 12 ccm. Hierdurch muß die Entleerung als sehr vollständig angesehen werden, und doch markiert die Berechnung durch die Auswaschmethode noch einen Rest von 0,0236 g N. Hierzu hat im Versuch 24 nicht nur keine Resorption stattgefunden, sondern ist sogar eine Zunahme von 0,0100 g N, also 9,5^o/_o binnen 75 Minuten zu verzeichnen. Diese Zunahme tritt erst zutage bei der Berechnung des Restes, denn in Portion A ließen sich nur 0,0054 g N in 14 ccm wiedergewinnen. Die Konzentrationsänderung an Lösungsbestandteilen war auch von 0,2246^o/_o auf 0,0392^o/_o zurückgegangen. Eine Erklärung hierfür habe ich bei der vorhergehenden Gruppe bei der Besprechung des Begriffes der Imbibition zu geben versucht, und ich werde noch später auf eine zweite Möglichkeit zu sprechen kommen.

In sämtlichen sechs Versuchen mit Witte-Pepton hat eine Resorption stattgefunden, und wenn wir erst die Versuche 29 und 33, die eine Versuchsdauer von 30 Minuten umfassen, betrachten, so fällt ihre Einheitlichkeit besonders auf. Allerdings möchte ich noch vorausschicken, daß im Versuch 29 Magermilch, im Versuch 33 Milchserum als Lösungsmittel diente. Die Ursache dieser Wahl war, den Reiz des Peptons auf die Serosa zu vermindern, weil ich glaubte, dadurch die Schwankungen der Resorptionswerte herabsetzen zu können. Doch ist dies nicht einwandfrei gelungen.

Auch will ich gleich hier darauf aufmerksam machen, daß der Stickstoff des Lösungsmittels nicht mit einberechnet ist, denn so wie in den Portionen A und B ist auch in der eingeführten Flüssigkeit vor der Analyse das Eiweiß gefällt worden.

Die resorbierte Menge ist in den beiden Versuchen annähernd die gleiche, und zwar für Versuch 29 0,0200 g N, für Versuch 33 0,0255 g N, was einem Resorptionswert von 15% resp. 14,2% entspricht. Die wiedergewonnenen Flüssigkeitsmengen in Portion A waren auch fast dieselben, nämlich 42 ccm und 43 ccm, aber ihre Konzentration, analog der eingeführten Flüssigkeit, verschieden, darauf beruhend, daß es nicht gelingt, das Eiweiß im Milchserum so vollständig wie in der Magermilch zu fällen.

Diese Erscheinung tritt auch bei der Fällung des Eiweißes in den Transsudaten hervor und beeinflußt die Resorptionswerte bei den Peptonversuchen, analog mit den die Resorptionsverhältnisse bei den Eiweißkörpern verdeckenden Transsudaten. Ich habe dabei die Extraktivstoffe des Eiweißes im Auge und werde noch Gelegenheit haben darauf zurückzukommen.

In den sich hier anschließenden Versuchen 30 und 34, in denen nur die Versuchszeit die doppelte war, trat wiederum umgekehrt eine große Schwankung zutage.

Theoretisch wären in diesen Versuchen Resorptionswerte zu erwarten gewesen, die nicht voll dem Doppelten des vorangehenden entsprochen hätten, mit anderen Worten, Resorptionswerte von rund 0,040 g N oder 25%. Das war aber nicht der Fall, denn Versuch 30, dem Versuch 29 parallel gehend, zeigt einen Resorptionswert von nur 0,0008 g N oder 0,6% und der dem Versuch 33 entsprechende Versuch 34 dagegen ganze 0,0623 g N oder 38% an Resorption.

Beide sind meiner Ansicht nach Extreme, wofür ich allerdings keine andere Erklärung habe, als daß es die Residuen der Transsudate an Extraktivstoffen sind, die sich nicht haben fällen lassen. Und wie ich früher hervorgehoben habe, daß die Transsudate in der Bauchhöhle bei den Manipulationen nicht zu umgehen sind und je nachdem an Menge wechseln, so stelle ich für das Erscheinen der Extraktivstoffe im Transsudate nach

der Eiweißfällung dieselbe Vermutung auf. Diese Annahme findet eine Stütze in der Tatsache, daß bei der Eiweißfällung im Blute auch eine wechselnde Menge stickstoffhaltige Extraktivstoffe zurückbleiben (Folin, Bang).

Von den drei noch der Besprechung harrenden Peptonversuchen haben Versuch 5 und 15 Resorptionswerte von 0,0442 g N gleich 31% resp. 0,0340 g N oder 24% binnen 60 Minuten aufzuweisen.

Im Versuch 16, der ausnahmsweise sich über 5 Stunden erstreckte, sind 0,1063 g N oder 77% resorbiert worden. Nur der Versuch 5 zeigt in der wiedergewonnenen Portion A eine Konzentrationszunahme, weil hier versuchsweise destilliertes Wasser als Lösungsmittel zur Anwendung kam.

Berechne ich den Mittelwert aller vier Witte-Peptonversuche mit einer Versuchsdauer von 60 Minuten, so ergibt sich ein Resorptionswert von 0,0353 g N oder 23,7%, eine Zahl, an der festzuhalten ist, weil sie für sämtliche Peptonversuche in 60 Minuten die wahrscheinlichste zu sein scheint.

Die entsprechenden Werte für 30 Minuten aus den Versuchen 29 und 33 wären 0,0227 g N und 14,6%.

4. Resorptionsversuche mit hydrolysiertem Casein.

Versuch 6. 28. I. 16.

Kaninchen 1300 g.

9^h25 50 ccm 2%ige Caseinlösung (hydrolysierte) in die Bauchhöhle.

10^h25 29 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Gesamt-N der eingeführten Caseinlösung in Proz. . .	0,2702
" " " wiedergewonnenen " " " . . .	0,1791
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde . . .	0,1351 g
" " " " " resorbiert " " . . .	0,0481 g
Formol-N der eingeführten Caseinlösung in Proz. . .	0,2100
" " " wiedergewonnenen " " " . . .	0,0840
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde . . .	0,1050 g
" " " " " resorbiert " " . . .	0,0667 g

Versuch 7. 1. II. 16.

Kaninchen 2800 g.

10^h35 100 ccm 2%ige Caseinlösung (hydrolysierte) in die Bauchhöhle.

11^b35 21 ccm Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Gesamt-N der eingeführten Caseinlösung in Proz.	. 0,2590
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,2344
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,2590 g
" " " " " resorbiert " "	. 0,0885 g
Formol-N der eingeführten Caseinlösung in Proz.	. 0,1771
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,0924
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,1771 g
" " " " " resorbiert " "	. 0,0737 g

Versuch 8. 4. II. 16.

Kaninchen 2000 g.

9^b50 100 ccm 2^o/_oige Caseinlösung (hydrolysierte) in die Bauchhöhle.

10^b50 19 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Gesamt-N der eingeführten Caseinlösung in Proz.	. 0,2280
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,1090
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,2280 g
" " " " " resorbiert " "	. 0,1060 g
Formol-N der eingeführten Caseinlösung in Proz.	. 0,1700
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,0756
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,1700 g
" " " " " resorbiert " "	. 0,1302 g

Versuch 20. 1. III. 16.

Kaninchen 2050 g.

9^b50 50 ccm 2^o/_oige Caseinlösung (hydrolysierte) in die Bauchhöhle.

10^b20 16 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Gesamt-N der eingeführten Caseinlösung in Proz.	. 0,2440
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,0762
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,1220 g
" " " " " resorbiert " "	. 0,0798 g
Formol-N der eingeführten Caseinlösung in Proz.	. 0,2022
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,0472
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,1011 g
" " " " " resorbiert " "	. 0,0803 g

Versuch 21. 1. III. 16.

Kaninchen 1950 g.

9^h55 50 ccm 2^o/_oige Caseinlösung (hydrolysierte) in die Bauchhöhle.

10^h55 61 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Gesamt-N der eingeführten Caseinlösung in Proz.	. 0,2440
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,0882
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,1220 g
" " " " resorbiert " "	. 0,0505 g
Formol-N der eingeführten Caseinlösung in Proz.	. 0,2022
" " " wiedergewonnenen " " "	. 0,0728
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	. 0,1011 g
" " " " resorbiert " "	. 0,0500 g

Die Gruppe des hydrolysierten, tyrosinfreien Caseins umfaßt 5 Versuche und hiervon vier mit einer Versuchsdauer von 60 Minuten. In sämtlichen Versuchen hat nicht nur eine Resorption stattgefunden, sondern es sind die Resorptionswerte viel größer als bei den Peptonversuchen. Dabei fällt es besonders auf, daß die höhere Resorptionsgeschwindigkeit beim hydrolysierten Casein eigentlich dem darin enthaltenen formoltitrierbaren Stickstoff zukommt.

Denn wenn man die resorbierten Mengen an Gesamt-N und Formol-N miteinander vergleicht, so hat es den Anschein, als würde nur das Formol-N resorbiert worden sein.

Die ursprünglich saure Caseinlösung wurde in der Mehrzahl der Fälle neutralisiert.

In den Versuchen 6, 7, 8 und 21, deren Resorptionswerte sich auf 60 Minuten beziehen, wurden 0,2702 g, 0,2590 g, 0,2282 g und 0,2440 g an absoluten Mengen Gesamt-N eingeführt. Von diesen waren ebenfalls in absoluten Mengen 0,2100 g, 0,1771 g, 0,1700 g und 0,2022 g Formol-N. Die resorbierten absoluten Mengen waren in derselben Reihenfolge 0,0481 g, 0,0885 g, 0,1060 g und 0,0505 g Gesamt-N sowie 0,0667 g, 0,0737 g, 0,1302 g und 0,0500 g Formol-N.

Die resorbierten Mengen in Prozent sind in der Prozenttabelle zusammengestellt, weshalb ich nur hier die runden Mittelwerte in Prozent hervorhebe.

Diese waren für den Gesamt-N 40^o/_o und für den Formol-N

58⁰/₀. Versuch 20 hatte eine Versuchsdauer von 30 Minuten und wurde gleichzeitig mit Versuch 21 ausgeführt.

Daher sind die eingeführten Mengen die gleichen, und zwar 0,2440 g Gesamt-N und 0,2022 g Formol-N. Die Resorptionsgeschwindigkeit ist in diesen Versuchen eine abnorm hohe. Sie beträgt 0,0798 g resp. 0,0803 in 30 Minuten (Versuch 20). Das macht im resorbierten Prozent 65⁰/₀ resp. 79⁰/₀ aus, gegenüber dem Parallelversuch 21 mit 40⁰/₀ resp. 50⁰/₀ in 60 Minuten.

Die Resorptionswerte sind auch hier allerdings schwankend, doch lassen sie unzweideutig eine größere Resorptionsgeschwindigkeit, mit den Peptonversuchen verglichen, erkennen.

Der Umstand, daß in den Versuchen 6 und 8 die resorbierte Menge an Gesamt-N kleiner ist als die an Formal-N, muß als ein Versuchsfehler angesprochen werden.

Denn ziehe ich die niedrigen Versuchsnummern in Betracht, wo ich vielleicht noch nicht die Technik so gut beherrschte wie bei den höhern, sowie daß das umgekehrte Verhältnis im Versuch 8 stattfand, und stelle ich noch das Resultat dieser drei Versuche gegenüber den Versuchen 20 und 21, in denen die beiden N gleich groß sind, so ist meine schon vorhin ausgesprochene Annahme, daß der resorbierte Stickstoff hier als Formol-N anzusehen ist, wohl berechtigt. In dieser Gruppenbesprechung erfordert noch ein Punkt eine Bemerkung.

Die Analysenwerte sowohl des Gesamt-N's wie des Formol-N's für die eingeführten Caseinlösungen sind verschieden, obgleich die Konzentration doch die gleiche, d. h. 2⁰/₀ an Lösungsbestandteilen, nach dem Abwiegen des Caseins, sein sollte. Ich möchte diese Differenz darauf zurückführen, daß das hydrolysierte Casein nicht in Substanz gleichmäßig war. Es zeigte zum Teil gröbere Körnerkonglomerate von brauner Farbe und zum Teil staubförmige Körnchen ungleichmäßig im Glase vermischt.

5. Resorptionsversuche mit Aminosäuren.

Versuch 11. 11. II. 16.

Kaninchen 1500 g.

10^h00 50 ccm 2⁰/₀ ige α -Alaninlösung in die Bauchhöhle.

10^h30 46 „ Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.

Formol-N der eingeführten Alaninlösung in Proz.	0,3017
" " " wiedergewonnenen " " " 	0,1050
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	0,1508 g
" " " " " resorbiert " 	0,0905 g

Versuch 12. 11. II. 16.

Kaninchen 1600 g.

9 ^b 55 50 ccm 2 ^o / _o ige α -Alaninlösung in die Bauchhöhle.	
10 ^b 55 39 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.	
Formol-N der eingeführten Alaninlösung in Proz.	0,3017
" " " wiedergewonnenen " " " 	0,0980
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	0,1508 g
" " " " " resorbiert " 	0,0881 g

Versuch 27. 16. III. 16.

Kaninchen 1800 g.

9 ^h 55 50 ccm 2 ^o / _o ige Caseinlösung mit 2 ^o / _o igem α -Alanin in Ringerlösung in die Bauchhöhle.	
10 ^b 25 37 ccm Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.	
Formol-N der eingeführten Lösung in Proz.	0,4452
" " " wiedergewonnenen Lösung in Proz.	0,1157
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	0,2226 g
" " " " " resorbiert " 	0,1312 g

Versuch 28. 16. III. 16.

Kaninchen 1800 g.

10 ^b 00 50 ccm Ringerlösung mit 2 ^o / _o Casein und 2 ^o / _o α -Alanin in die Bauchhöhle.	
11 ^b 00 27 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.	
Formol-N der eingeführten Lösung in Proz.	0,4452
" " " wiedergewonnenen Lösung in Proz.	0,0750
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	0,2226 g
" " " " " resorbiert " 	0,1774 g

Versuch 17. 24. II. 16.

Kaninchen 1850 g.

10 ^b 00 50 ccm 2 ^o / _o ige Glutaminsäurelösung in die Bauchhöhle.	
10 ^b 30 48 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.	

Formol-N der eingeführten Lösung in Proz.	0,1624
" " " wiedergewonnenen Lösung in Proz.	0,0728
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	0,0812 g
" " " " " resorbiert " 	0,0315 g

Versuch 18. 24. II. 16.

Kaninchen 1450 g.

10 ^h 05 50 ccm 2 ^o / _o ige Glutaminsäurelösung in die Bauchhöhle	
11 ^h 05 40 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.	
Formol-N der eingeführten Lösung in Proz.	0,1624
" " " wiedergewonnenen Lösung in Proz.	0,0567
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	0,0812 g
" " " " " resorbiert " 	0,0395 g

Versuch 19. 28. II. 16.

Kaninchen 1700 g (2 mal).

3 ^h 25 50 ccm 2 ^o / _o ige Glykokollösung in die Bauchhöhle.	
3 ^h 55 51 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.	
Formol-N der eingeführten Glykokollösung in Proz.	0,3731
" " " wiedergewonnenen " " " 	0,1305
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	0,1865 g
" " " " " resorbiert " 	0,1001 g

Versuch 25. 8. III. 16.

Kaninchen 2050 g (6 mal).

9 ^h 50 50 ccm 2 ^o / _o ige Asparaginsäurelösung in die Bauchhöhle.	
10 ^h 20 26 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.	
Formol-N der eingeführten Lösung in Proz.	0,2196
" " " wiedergewonnenen Lösung in Proz.	0,0740
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	0,1098 g
" " " " " resorbiert " 	0,0587 g

Versuch 26. 8. III. 16.

Kaninchen 1300 g.

10 ^h 00 50 ccm 2 ^o / _o ige Asparaginsäurelösung in die Bauchhöhle.	
11 ^h 00 45 " Flüssigkeit aus der Bauchhöhle.	

Formol-N der eingeführten Lösung in Proz.	0,2196
" " " wiedergewonnenen Lösung in Proz.	0,0504
" " , absolute Menge, die eingeführt wurde	0,1098 g
" " " " " " resorbiert " 	0,0518 g

Die Versuche 11, 12, 17, 18, 19, 25, 26, 27 und 28 gehören der Gruppe der Aminosäuren an. Unter ihnen kann man fallende Resorptionswerte an absoluten Mengen in 30 Minuten in der Reihenfolge Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure beobachten. Für die Versuche 19, 11, 25 und 17 wäre diese in Zahlen ausgedrückt 0,1001 g, 0,0905 g, 0,0587 g und 0,0315 g Formol-N, dem N-Gehalt der eingeführten Lösung entsprechend, die 0,1865 g, 0,1498 g, 0,1061 g und 0,0798 g betrug.

Prozentual tauschen allerdings Glykokoll mit dem Alanin in der Reihenfolge den Platz, wie aus der Prozenttabelle ersichtlich ist. Für die Versuchsdauer von 60 Minuten fehlt mir leider ein Glykokollversuch. Drei Glykokollversuche mißlingen, und zwar nur bei Glykokoll, und ich hatte nicht später Gelegenheit, diese Lücken auszufüllen. Doch kann die Frage der Reihenfolge der Resorptionsgeschwindigkeit der Aminosäuren ruhig offen bleiben. Ich könnte doch nicht mit dieser kleinen Zahl diesbezüglicher Versuche eine Entscheidung treffen.

In den Versuchen 12, 26 und 18 sind die resorbierten absoluten Mengen in 60 Minuten 0,0881 g, 0,0518 g und 0,0395 g bei eingeführten Mengen Formol-N, die den in den Versuchen während 30 Minuten gleich groß sind.

Prozentual tauscht hier die Asparaginsäure mit der Glutaminsäure Platz, wie die Zahlen in der Prozenttabelle zeigen.

Sonst bleibt die Reihenfolge dieselbe.

Für die Versuche 27 und 28 war das α -Alanin in Ringerlösung mit 2% Casein (Grübler) in 2%iger Konzentration zusammengebracht worden. Dementsprechend sind die Werte des Formol-N's der eingeführten wie der resorbierten Flüssigkeit höher, aber doch die, für die der reinen α -Alanin gefundenen, nach Abzug des Formol-N's des Caseins, annähernd gleichen. Hier war es notwendig, vor der Formoltitration die störende weiße Farbe durch Fällen zu beseitigen. Daß die Fällung nicht in allen Portionen gleich vollständig war, ist

leicht verständlich, und darum kann ich auch nicht diesen Resorptionswerten denselben Wert beimessen wie in den Versuchen mit reinem, einfachem Alanin.

Zur Kontrolle wurde neben dem Formol-N der Gesamt-N bestimmt und, wie die Generaltabelle zeigt, war die Übereinstimmung mit einer Ausnahme, bei dem Versuch 25, gut. Die Ursache für diese Ausnahme kann ich nicht angeben.

Interessehalber möchte ich noch erwähnen, daß Bang in einer vor kurzem erschienenen Arbeit über Resorption und Assimilation von Eiweiß und Aminosäuren für den Formol-N des Alanins und des Glykokolls für 1 g umgerechnet die Werte 0,1488 g und 0,1560 g resp. 0,1860 g und 0,1860 g aus je zwei Bestimmungen angibt.

Meine diesbezüglichen Werte des Formol-N's sind für Alanin 0,1498 g und für Glykokoll 0,1865 g.

Zu den Versuchen 25 und 26 will ich noch bemerken, daß die Asparaginsäurelösung ausnahmsweise stark sauer infundiert wurde, weil sie in 2^o/_oiger Lösung ohne auszufallen nicht hätte neutralisiert werden können. Bei der Formoltitration konnte ich dagegen die Neutralisation dadurch vornehmen, daß ich die Lösung auf fast das 3fache verdünnte. Daß durch diesen Umstand der Resorptionswert eventuell beeinflußt werden konnte, ist nicht von der Hand zu weisen.

Auf Grund hier niedergelegter Tatsachen durfte der Schluß gezogen werden, daß die Resorptionswerte der Aminosäuren größer sind als die des Peptons und des hydrolysierten Caseins in derselben Zeit und Konzentration, und zwar näherte sich diese dem Werte 50 bis 65^o/_o der eingeführten Menge an Lösungsbestandteilen in 60 Minuten. Als bemerkenswert möchte ich noch hervorheben, daß der Formol-N der Aminosäuren 20 bis 30^o/_o größer ist als dieser im hydrolysierten Casein, was in den Resorptionswerten im selben Verhältnis zum Ausdruck kommt.

Es erübrigt sich noch, an dieser Stelle meine Befunde denen der Resorption aus dem Darne für Pepton, hydrolysiertes Casein und Aminosäuren gegenüberzustellen.

Obgleich für Milch und Casein ein Vergleich der Resorption aus dem Darne mit der aus der Bauchhöhle infolge von den hier hinzukommenden Transsudaten, wie ich im vorigen

auseinandergelegt habe, nicht zugänglich ist, zeigt die Darmresorption und die in der Bauchhöhle für Pepton, hydrolysiertes Casein und Aminosäuren bemerkenswerte Unterschiede.

So fand Messerli für Pepton die hohe Resorptionsgeschwindigkeit von 26,6% in 10 Minuten und vor ihm Zunz eine solche von 50% in 60 Minuten. Und wenn auch nicht die Resorptionsgröße als proportional mit der Zeit angesehen werden darf, zeigt doch meine Resorptionszahl für Pepton in der Bauchhöhle mit 24% in 60 Minuten einen gewaltig kleineren Wert.

Tabelle I.

Zusammenstellung der resorbierten Mengen an Lösungsbestandteilen in absoluten Mengen und in Prozent berechnet nach der Methode von Roth.

Versuchs-Nr.	Substanz	Resorbiert				Versuchsdauer	Bemerkungen
		Gesamt-N		Formol-N			
		absolute Menge mg	%	absolute Menge mg	%		
10	Milch	170,0	33,4			60'	zentrifugiert
5	Witte-Pepton	44,20	31,5			60'	in Aq. dest.
15	"	34,0	24,7			60'	" 1% NaCl-Lösung
30	"	0,86	0,6			60'	" Magermilch
34	"	62,30	38,0			60'	" Milchserum
24	Fleisch-Pepton	+10,65	+ 9,5			75'	" 1% NaCl-Lösung
6	hydrol. Casein	48,13	35,6	66,25	63,5	60'	" 1% NaCl-Lösung, sauer
7	" "	88,50	34,1	73,7	41,8	60'	" 1% NaCl-Lösung, schwach alk.
8	" "	106,0	46,0	130,27	77,0	60'	" 1% NaCl-Lösung, amphoter
21	" "	50,56	41,4	50,0	50,0	60'	" 1% NaCl-Lösung, amphoter
12	α -Alanin	88,0	58,7	88,13	58,4	60'	" 1% NaCl-Lösung
28	"	—	—	177,4	80,0	60'	" Ringerlösung mit 2% Casein
18	Glutaminsäure	38,80	48,6	39,52	48,6	60'	" 1% NaCl-Lösung
26	Asparaginsäure	49,46	46,6	51,89	47,2	60'	" 1% "
9	Milch	+46,2	+ 9,0			30'	zentrifugiert
29	Witte-Pepton	20,0	15,0			30'	in Magermilch
33	"	25,5	14,2			30'	" Milchserum
23	Fleischpepton	30,14	26,7			30'	" 1% NaCl-Lösung
20	hydrol. Casein	79,8	65,4	80,38	79,6	30'	" 1% "
11	α -Alanin	88,8	59,0	90,50	60,0	30'	" 1% "
27	"	—	—	141,25	63,4	30'	" Ringerlösung mit 2% Casein
17	Glutaminsäure	25,06	31,4	31,50	38,8	30'	" 1% NaCl-Lösung
19	Glykokoll	98,45	52,7	100,10	53,6	30'	" 1% "
25	Asparaginsäure	20,13	18,8	58,78	54,0	30'	" 1% "

Tabelle II.

Zusammenstellung der Konzentrationsänderung an Lösungsbestandteilen der infundierten Lösungen nach 30 Minuten.

 N_G = Gesamt-N N_F = Formol-N

Versuchs-Nr.	Lösungsbestandteile in Gramm								Versuchsdauer	Bemerkungen
	der infundiert. Lösung		der Portion A		Differenz		Differenz in ‰			
	N_G	N_F	N_G	N_F	N_G	N_F	N_G	N_F		
9	0,5082		0,4788		0,0294		5,7		30'	Zentrifugierte Milch
29	0,2660		0,1575		0,1085		40,0		30'	2‰ige Peptonlösung in Magermilch
33	0,3276		0,2267		0,1009		30,5		30'	2‰ige Peptonlösung in Milchserum
23	0,2246		0,0945		0,1300		58,0		30'	2‰ige Fleischpeptonlösung in 1‰iger NaCl-Lösung
20	0,2440	0,2020	0,0762	0,0472	0,1678	0,1548	68,7	76,6	30'	2‰ige Caseinlösung (hydrolysiert.), amphoter
11	0,2996	0,3017	0,1064	0,1050	0,1932	0,1967	64,4	66,6	30'	2‰ige α -Alaninlös. in 1‰iger NaCl-Lösung
27	—	0,4452	—	0,1157	—	0,3300	—	74,3	30'	2‰ige α -Alaninlös. mit 2‰ Casein in Ringerlösung
17	0,1596	0,1624	0,0806	0,0724	0,0790	0,0900	49,4	55,4	30'	2‰ige Glutaminsäure-Lösung in 1‰iger NaCl-Lösung
19	0,3731	0,3731	0,1295	0,1305	0,2436	0,2400	65,1	64,3	30'	2‰ige Glykokollös. in 1‰iger NaCl-Lösung
25	0,2120	0,2196	0,0710	0,0740	0,1410	0,1456	66,4	66,1	30'	2‰ige Asparaginsäurelösung in 1‰iger NaCl-Lös.

Indem die Resorptionsgeschwindigkeit im Darm für weiter abgebaute Eiweißprodukte nach Messerli abnimmt, ist in der Bauchhöhle gerade nach meinen Versuchen das umgekehrte der Fall.

Messerli hat für seine Befunde eine Stütze in denen von Nolf und seinen Mitarbeitern, obgleich sie sich nicht mit den Befunden anderer Autoren, wie Abderhalden und Zunz, decken.

Würden nun aber die Ergebnisse meiner Resorptionsversuche eine Bestätigung finden, so müßte daraus der Schluß gezogen werden, daß der resorptive Vorgang in der Bauch-

Tabelle III.

Zusammenstellung der Konzentrationsänderung an Lösungsbestandteilen der infundierten Lösungen nach 60 Minuten.

N_G = Gesamt-N

N_F = Formol-N

Versuchs-Nr.	Lösungsbestandteile in Gramm								Versuchsdauer	Bemerkungen
	der infundiert. Lösung		der Portion A		Differenz		Differenz in %			
	N_G	N_F	N_G	N_F	N_G	N_F	N_G	N_F		
10	0,5802		0,4424		0,1378		24,7		60'	Zentrifugierte Milch
5	0,2800		0,3136		+ 0,0336		+ 10,0		60'	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in Aq. dest.
15	0,2747		0,1176		0,1571		57,3		60'	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in 1 ⁰ / ₀ iger NaCl-Lösung
30	0,2660		0,1533		0,1127		42,3		60'	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in Magermilch
34	0,3276		0,1596		0,1680		51,2		60'	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in Milchserum
24	0,2246		0,0392		0,1854		82,5		75'	2 ⁰ / ₀ ige Fleischpeptonlösung in 1 ⁰ / ₀ iger NaCl-Lösung
6	0,2702	0,2100	0,1791	0,0840	0,0911	0,1260	33,6	60,0	60'	2 ⁰ / ₀ ige Caseinlösung (hydrolys.), sauer
7	0,2590	0,1771	0,2344	0,0924	0,0246	0,0847	9,5	47,8	60'	2 ⁰ / ₀ ige Caseinlösung (hydrolysierte), schwach alkalisch
8	0,2280	0,1701	0,1090	0,0756	0,1190	0,0945	52,1	55,5	60'	2 ⁰ / ₀ ige Caseinlösung (hydrolysierte), amphoter
21	0,2440	0,2020	0,0882	0,0728	0,1558	0,1300	63,8	64,3	60'	2 ⁰ / ₀ ige Caseinlösung (hydrolysierte), amphoter
12	0,2996	0,3017	0,0896	0,0980	0,2100	0,2037	70,0	67,5	60'	2 ⁰ / ₀ ige α -Alaninlös. in 1 ⁰ / ₀ iger NaCl-Lösung
28	—	0,4452	—	0,0750	—	0,3702	—	83,1	60'	2 ⁰ / ₀ ige α -Alaninlös. mit 2 ⁰ / ₀ Casein in Ringerlösung
18	0,1596	0,1624	0,0609	0,0567	0,0987	0,1057	62,0	65,0	60'	2 ⁰ / ₀ ige Glutaminsäure-Lösung in 1 ⁰ / ₀ iger NaCl-Lösung
26	0,2120	0,2196	0,0710	0,0740	0,1410	0,1456	66,4	66,0	60'	2 ⁰ / ₀ ige Asparaginsäurelösung in 1 ⁰ / ₀ iger NaCl-Lös.

höhle von dem im Darm durchaus verschieden ist, mag man nun die Capillaren allein oder diese und diese Zellen der Serosa zusammen für die Resorption verantwortlich machen.

Ich schließe noch hier außer der Generaltabelle und der Prozenttabelle (Tabelle I) eine Zusammenstellung der Konzen-

Tabelle IV.
Über die Resorptionsversuche mit Casein durch Bestimmung seines Gehaltes an Phosphor.
P = Phosphor.

Versuchs-Nr. Datum	Eingeführt				Entnommen Portion A				Entnommen Portion B				Bemerkungen
	Menge cm	Titri- metrisch P ₀ mg	P ₀ %	Gravi- metrisch P ₀ mg	Menge cm	Titri- metrisch P' mg	P' %	Gravi- metrisch P' mg	Menge cm	Titri- metrisch P'' mg	P'' %	Gravi- metrisch P'' mg	
31 23. März 16	50	6,2	0,0124	6,44	45	4,10	0,0091	4,10	50	3,1	0,0124	5,52	B > A
32 23. März 16	50	6,2	0,0124	6,44	33,3	4,64	0,0140	4,84	50	2,7	0,0060	3,96	B < A

trationsänderung an Lösungsbestandteilen der eingeführten verglichen mit den wiedergewonnenen Flüssigkeiten für sämtliche Versuche an (Tabelle II u. III).

Ogleich die Schwankungen der Resorptionswerte derselben Gruppe und unter den sonst gleichen Bedingungen der Kompliziertheit der Versuche zum Teil zugeschrieben werden können, so liegt doch nach meinem Dafürhalten der Hauptgrund hierfür in den individuellen Momenten der Versuchstiere.

Diese kommen besonders deutlich zum Ausdruck in den zwei nachfolgenden Zusammenstellungen, welche in zwei Serien nach der Versuchsdauer zusammengetragen sind (Tabelle II u. III).

Nur in einem Falle hat eine Konzentrationszunahme stattgefunden, und zwar in dem Versuch 5, wo das Pepton in destilliertem Wasser gelöst war.

In sämtlichen anderen Versuchen war das Lösungsmittel fast isotonisch mit dem Blutplasma des Versuchstieres und in den meisten Fällen aus einer 1%igen NaCl-Lösung bestehend.

Die Regellosigkeit der Konzentrationsänderung ist

doch da, wie aus den Tabellen ohne weitere Worte abzulesen ist.

6. Resorptionsversuche mit Casein durch Bestimmung des resorbierten Phosphors.

Hier unten folgen noch 2 Versuche, die die Aufgabe haben, die Resorptionsgeschwindigkeit des Caseins durch Ermittlung des resorbierten Phosphors zu bestimmen. Der Zweck dieser Versuche ist schon unter den Methoden angegeben worden, und ich habe auch dort selbst auf die Schwierigkeiten bei der Phosphorbestimmung unter den vorhandenen Verhältnissen aufmerksam gemacht. An dieser Stelle bleibt noch übrig, das Resultat zu besprechen; ich schließe die Besprechung gleich der Tabelle an.

Ich würde ja selbst kein großes Gewicht den hier erhaltenen Zahlen beilegen, wenn nicht diese Zahlen, durch zwei verschiedene Methoden gewonnen, mit einer Ausnahme, innerhalb der zulässigen Fehlergrenzen miteinander übereinstimmen.

Der Phosphor (P) wurde bei der Titration aus dem gefundenen P_2O_5 -Wert und gewichtsanalytisch aus dem $Mg_2P_2O_7$ nach den chemischen Tabellen ermittelt. Wegen der Kleinheit der Phosphormengen, mit denen ich zu arbeiten hatte, muß in der Regel, da 1 g Casein 0,0087 g Phosphor enthält und mir nur ein Bruchteil hiervon für die Doppelanalysen zur Verfügung stand, eine Differenz unter 0,001 g im Zahlenergebnis zwischen den beiden Methoden als unvermeidlich angesehen werden, dies um so mehr, als das Kochsalz einerseits die genaue gewichtsanalytische Bestimmung des Phosphors beeinträchtigt und andererseits auch dessen Dissoziation bei der Titration auf den Farbumschlag störend einwirkt. Waren doch in der Lösung nur 0,0124% Phosphor gegenüber 1% NaCl vorhanden. Doch glaube ich mich auf die erhaltenen Zahlenwerte stützen und aus diesen beiden Versuchen schließen zu dürfen, daß das Casein nicht aus der Bauchhöhle resorbiert wird. Denn obgleich in dem Versuch 31 der Phosphorgehalt der eingeführten Caseinlösung in Prozenten sich in einer halben Stunde von 0,0124 auf 0,009 vermindert hatte, so zeigt doch die absolute Menge nur eine Abnahme von 0,0062 g P auf 0,0041 g P bei einer wiedergewonnenen

Flüssigkeitsmenge von 45 ccm gegenüber 50 ccm infundierter Caseinlösung. Die Differenz von 0,0021 g P, obgleich ein Drittel des eingeführten P ausmachend, kann auch wegen seiner absoluten Kleinheit als der zurückgebliebene Rest aufgefaßt werden.

Diese Annahme ist um so mehr berechtigt, als nach der Auswaschung der Bauchhöhle mit 50 ccm 1%iger NaCl-Lösung noch 0,0031 g P aus dem Waschwasser gewonnen werden konnten.

In dem Versuch 32 dagegen, in welchem die gleiche Menge sowohl absolut wie prozentual an Phosphor infundiert wurde, sind bei der Entleerung der Portion A nach einer Stunde in absoluter Menge 0,00464 g P, prozentual 0,0140% wiedergewonnen worden. Nach der Auswaschung der Bauchhöhle fanden sich noch 0,0027 g P in dem Waschwasser vor.

Diese beiden Versuche zeigen eine große Ähnlichkeit und Übereinstimmung. In beiden Fällen konnten bis auf rund 0,002 g P in der Portion A wiedergewonnen werden und in Portion B, d. h. in dem Waschwasser, war noch ein in den beiden Versuchen fast gleich großer Rest an P. Daß beide Portionen zusammen mehr P enthielten als eingeführt worden war, stützt nach meiner Ansicht die vorhin ausgesprochene Schlußfolgerung, daß kein Casein resorbiert worden ist.

Zusammenfassung.

In den von mir angestellten Resorptionsversuchen in der Bauchhöhle des Kaninchens waren die Injektionsflüssigkeiten Milch, Casein, Witte-Pepton, Fleischpepton, hydrolysiertes Casein und Aminosäuren (Glykokoll, Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure). Das Ergebnis kann ich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Es konnte festgestellt werden, daß die Bestimmung der Resorption durch Berechnung des resorbierten Stickstoffes bei Milch, Casein infolge von den in der Bauchhöhle bei den Versuchen hinzutretenden Transsudaten illusorisch ist. Die Berechnung der Resorptionsgeschwindigkeit des Caseins auf Grund des darin enthaltenen und resorbierten Phosphors wäre theoretisch möglich, doch bieten die bis jetzt bekannten Methoden wegen der geringen Mengen des Phosphors für die Analyse große Schwierigkeiten.

Versuchs- nummer Datum	Eingeführt				Entnommen Portion A						Ausgew. mit 1% NaCl	Entnommen			
	Menge ccm	N ^o _G mg	N ^o _G g %	N ^o _F mg	N ^o _F g %	nach Min.	Menge ccm	N' _G mg	N' _G g %	N' _F mg		N' _F g %	Menge ccm	N'' _G mg	N'' _G g %
9 9. Febr. 16	100	508,2	0,5082	—	—	30'	16	75,608	0,4788	—	—	88	20	50,96	0,2548
10 9. Febr. 16	100	508,2	0,5082	—	—	60'	10	44,24	0,4424	—	—	88	43	81,87	0,1904
22 3. März 16	50	131,6	0,2632	—	—	30'	13	61,15	0,4704	—	—	50	25	42,0	0,1680
5 25. Januar 16	50	140,0	0,2800	23,10	0,0462	60'	15	47,04	0,3136	21,84	0,1456	100	43	18,06	0,0420
15 21. Febr. 16	50	137,2	0,2747	23,10	0,0462	60'	40	47,04	0,1176	10,08	0,0252	50	68	39,0	0,0574
16 21. Febr. 16	50	137,0	0,2747	23,10	0,0462	5 ^h	8	4,03	0,0504	5,37	0,0672	100	40	7,0	0,0175
29 22. März 16	50	133,0	0,2660	—	—	30'	42	66,15	0,1575	—	—	50	52	30,57	0,0588
30 22. März 16	50	133,0	0,2660	—	—	60'	60	91,98	0,1533	—	—	50	52	27,3	0,0525
33 28. März 16	50	163,8	0,3276	—	—	30'	43	97,5	0,2267	—	—	50	32	19,11	0,060
34 28. März 16	50	163,8	0,3276	—	—	60'	45	71,82	0,1596	—	—	50	43	18,62	0,0433
23 6. März 16	50	112,3	0,2246	42,0	0,0840	30'	62	58,59	0,0945	27,34	0,0441	50	31	9,8	0,0316
24 6. März 16	50	112,3	0,2246	42,0	0,0840	75'	14	5,48	0,0392	4,11	0,0294	50	15	5,04	0,0336
6 28. Januar 16	50	135,1	0,2702	105,0	0,2100	60'	29	51,96	0,1791	24,36	0,0840	50	38	19,15	0,0504
7 1. Febr. 16	100	259,0	0,2590	177,10	0,1771	60'	21	49,23	0,2344	19,04	0,0924	88	74	64,23	0,0868
8 4. Febr. 16	100	228,2	0,2282	170,10	0,1710	60'	19	20,75	0,1090	14,36	0,0756	88	24	13,44	0,0566
20 1. März 16	50	122,0	0,2440	101,15	0,2020	30'	16	12,19	0,0762	7,56	0,0472	50	34	11,42	0,0336

tabelle.

Portion B		Rest				Ab- oder Zunahme				Bemerkungen
N'' _F mg	N'' _F g %	N _G ccm	N _G mg	N _F ccm	N _F mg	in absoluten Mengen in mg		in %		
						N _G	N _F	N _G	N _F	
—	—	100,0	478,0	—	—	+ 46,2	—	+ 9,0	—	
—	—	66,40	294,2	—	—	— 170,0	—	— 33,46	—	desgl.
—	—	28,0	131,6	—	—	+ 61,10	—	+ 61,10	—	2 ⁰ / ₀ Casein (n. Hammarsten) in Aq. dest.
5,87	0,0136	15,55	48,76	10,34	15,0	— 44,20	—	— 31,57	+ 59,48	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in Aq. dest.
10,47	0,0154	47,83	56,24	77,0	11,85	— 34,0	—	— 24,78	— 5,05	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in 1 ⁰ / ₀ NaCl
4,90	0,0122	53,2	26,80	22,27	14,96	— 106,36	—	— 77,52	— 12,0	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in 1 ⁰ / ₀ NaCl
—	—	30,0	47,25	—	—	— 20,0	—	— 15,0	—	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in Magermilch
—	—	26,3	40,16	—	—	— 0,86	—	— 0,64	—	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in Magermilch
—	—	18,0	40,80	—	—	— 25,5	—	— 14,28	—	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in Milchserum
—	—	15,57	29,71	—	—	— 62,30	—	— 38,0	—	2 ⁰ / ₀ ige Peptonlösung in Milchserum
4,9	0,0158	25,0	23,62	23,2	10,64	— 30,14	— 4,0	— 26,78	— 9,52	2 ⁰ / ₀ iges Fleischpepton in 1 ⁰ / ₀ NaCl
3,36	0,0224	300,0	117,6	224,0	67,2	+ 10,65	+ 29,30	+ 9,5	+ 70,0	2 ⁰ / ₀ iges Fleischpepton in 1 ⁰ / ₀ NaCl
7,98	0,0210	19,57	35,0	16,66	13,89	— 48,13	— 66,75	— 35,62	— 63,57	2 ⁰ / ₀ ige Caseinlösung (hydrolys.), sauer
32,63	0,0452	51,75	121,30	84,8	84,0	— 88,50	— 73,7	— 34,14	— 41,8	2 ⁰ / ₀ ige Caseinlösung (hydrolys.), schwach alk.
5,04	0,0210	93,0	101,37	33,7	25,47	— 106,0	— 130,2	— 46,0	— 77,0	2 ⁰ / ₀ ige Caseinlösung (hydrolys.), amphoter
5,71	0,0168	39,43	30,0	28,0	13,21	— 79,25	— 80,38	— 65,41	— 79,46	2 ⁰ / ₀ ige Caseinlösung (hydrolys.), amphoter

Generaltabelle

Versuchsnummer Datum	Eingeführt					Entnommen Portion A					Ausgew. mit 1% NaCl	Entnommen			
	Menge ccm	N ^o _G mg	N ^o _G g %	N ^o _F mg	N ^o _F g %	nach Min.	Menge ccm	N' _G mg	N' _G g %	N' _F mg		N' _F g %	Menge ccm	N'' _G mg	N'' _G g %
21 1. März 16	50	122,0	0,2440	101,15	0,2020	60'	61	53,80	0,0882	44,40	0,0728	50	34	8,56	0,0252
11 11. Febr. 16	50	149,8	0,2996	150,8	0,3017	30'	46	48,94	0,1064	48,30	0,1050	50	39	7,64	0,0196
12 11. Febr. 16	50	149,8	0,2996	150,8	0,3017	60'	39	34,94	0,0896	38,22	0,0980	50	65	21,84	0,0336
27 16. März 16	50	—	—	222,6	0,4452	30'	37	—	—	42,83	0,1157	50	56	—	—
28 16. März 16	50	—	—	222,6	0,4452	60'	27	—	—	20,23	0,0750	50	50	—	—
17 24. Febr. 16	50	79,8	0,1596	81,2	0,1624	30'	48	38,64	0,0805	34,94	0,0728	50	36	8,31	0,0231
18 24. Febr. 16	50	79,8	0,1596	81,2	0,1624	60'	40	24,36	0,0609	22,68	0,0567	50	55	11,93	0,0217
19 28. Febr. 16	50	186,55	0,3731	186,55	0,3731	30'	51	66,0	0,1295	66,4	0,1305	50	46	15,45	0,0336
25 8. März 16	50	106,13	0,2120	109,85	0,2196	30'	26	18,48	0,0710	19,25	0,0740	50	57	26,46	0,0464
26 8. März 16	50	106,13	0,2120	109,85	0,2196	60'	45	24,57	0,0546	22,68	0,0504	50	51	14,99	0,0294
13 15. Febr. 16	50	—	—	—	—	60'	11	1,54	0,0140	—	—	50	25	—	—
14 15. Febr. 16	50	—	—	—	—	60'	30	5,04	0,0168	—	—	50	51	4,2	0,0086

2. Es ist eine steigende Resorptionsgeschwindigkeit in der Reihenfolge Pepton—hydrolysiertes Casein-Aminosäure gefunden worden, und zwar in Prozenten

[Fortsetzung].

Portion B		Rest				Ab- oder Zunahme				Bemerkungen
N'' _F	N'' _F	N _G	N _G	N _F	N _F	in absoluten Mengen		in ‰		
mg	g ‰	ccm	mg	ccm	mg	N _G	N _F	N _G	N _F	
3,80	0,0112	20,0	17,64	9,33	6,79	50,56	50,0	41,44	50,0	2‰ige Caseinlösung (hydrolys.), amphoter
7,64	0,0196	11,29	12,0	11,47	12,05	88,8	90,50	59,0	60,0	2‰ige α-Alaninlösung in 1‰ NaCl
12,15	0,0325	30,0	26,88	25,0	24,5	88,0	88,13	58,7	58,42	2‰ige α-Alaninlösung in 1‰ NaCl
26,13	0,0466	—	—	33,3	38,52	—	141,25	—	63,45	2‰ige α-Alaninlösung mit 2‰ Casein in Ringerlösung
15,0	0,0300	—	—	33,3	24,97	—	177,4	—	80,0	desgl.
7,56	0,0210	20,0	16,10	20,27	14,75	25,0	31,5	31,4	38,8	2‰ige Glutaminsäurelösung in 1‰ NaCl
12,32	0,0224	27,82	16,94	33,5	19,0	38,8	39,52	48,62	48,67	desgl.
14,16	0,0308	19,5	22,10	15,4	20,05	98,45	100,10	52,77	53,65	2‰ige Glykokollösung in 1‰ NaCl
19,6	0,0344	95,1	67,52	43,0	31,82	20,13	58,78	18,86	54,0	2‰ige Asparaginlösung in 1‰ NaCl
14,99	0,0294	58,8	32,10	70,0	35,28	49,46	51,89	46,60	47,2	desgl.
—	—	—	—	—	—	+	1,54	—	—	1‰ige NaCl-Lösung
—	—	47,85	8,033	—	—	+	13,073	—	—	desgl.

a) als abgerundete Mittelwerte 24‰ in 60 Minuten bei den Peptonversuchen und 15‰ in 30 Minuten;

b) 40‰ in 60 Minuten beim hydrolysierten Casein;

c) 50 bis 65% in 60 Minuten bei den Aminosäuren.

3. Die einzelnen Aminosäuren zeigten unter sich verschiedene Resorptionsgeschwindigkeiten, und zwar in fallender Reihenfolge Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure; doch ist die Zahl der Versuche noch zu gering, um eine Aufstellung einer Reihenfolge zu erlauben.

Die in dieser Arbeit mitgeteilten Versuche wurden, wie in der Einleitung auseinandergesetzt ist, in der Absicht ange stellt, die Permeabilität der Wände der Blutcapillargefäße für höhere Abbauprodukte des Eiweißes und für Aminosäuren miteinander zu vergleichen. Die Versuche haben dahin entschieden, daß die Permeabilität für die Aminosäuren viel größer ist als für Albumosen und Peptone. Da der Ausgangspunkt meiner Untersuchungen die von Messerli gefundene Tatsache war, daß die Resorptionsgeschwindigkeit der Albumosen und der Aminosäuren im Darm nicht wesentlich verschieden ist, so liegt der Schluß nahe, daß an dem Unterschied der Resorptionsgeschwindigkeit in der Peritonealhöhle und im Darmlumene die Leistungsfähigkeit des spezifischen Epithels des letzteren schuld sei. Auf dieses Problem soll nicht eingegangen werden, vielmehr nur ein anderer nicht unwichtiger Punkt hervorgehoben werden. In meinen Untersuchungen ist der Nachweis geliefert worden, daß die Capillarwände für Aminosäuren leicht permeabel sind. Da neuerdings das normale Vorkommen von Aminosäuren im Blute nachgewiesen worden ist, ist die Bedeutung der funktionellen Anpassung der Capillarwände an eine physiologische Leistung einleuchtend und die Anschauung, daß die einzelnen Zellen aus dem Blutwege die erforderlichen Aminosäuren erhalten, findet in meinen Ergebnissen eine experimentelle Stütze. Ich weise schließlich darauf hin, daß die Permeabilität der Capillarwände für Aminosäuren mit jenen Ansichten, welche Permeabilität und Lipoidgehalt der Zellen in einen engen Zusammenhang bringen wollen, kaum ungezwungen in Einklang gebracht werden kann.

4. Da die Blutcapillaren den wesentlichen Ort der Resorption in der Peritonealhöhle darstellen, folgt aus diesen Ergebnissen, daß in den Wänden der Blutcapillaren die Permeabilität der Aminosäuren größer ist als die der höheren Abbauprodukte des Eiweißes.

5. Der Unterschied zwischen der Resorptionsgeschwindigkeit in der Peritonealhöhle und im Darm kann auf die spezifische Leistung der Darmepithelien zurückgeführt werden.

Literatur.

Asher: III. Die Anwendung physikalisch-chemischer Methoden in der Physiologie.

— Handb. d. physiol. Methoden S. 115.

— Untersuchungen über die physiologische Permeabilität der Zellen.

II. Teil. Diese Zeitschr. 14, 45, 1908.

Bang, I.: Über Resorption und Assimilation von Eiweiß und Aminosäuren. Diese Zeitschr. 74, 278, 1916.

— Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile. 1916.

Cohnstein: Arch. f. d. ges. Physiol. 59, 1895.

Hamburger: Über die Regelung der osmotischen Spannkraft von Flüssigkeiten in Bauch- und Peritonealhöhle. Arch. f. Anat. und Physiol. Physiol. Abt. 1895, 281.

Hebebrandt: Zeitschr. f. analyt. Chem. 37, 217, 1898.

Heidenhain, R.: Arch. f. d. ges. Physiol. 56, 600, 1894.

Höber: Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe. 1914.

Jessen-Hansen: Die Formtitration. Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 6, 262, 1912.

Leathes and Starling: On the absorption of salt solutions from the pleural cavities. Journ. of Physiol. 18, 106, 1895.

Lebküchner: zit. nach Hamburger.

Magendie: zit. nach Hamburger.

Mandel und Neuberg: Diese Zeitschr. 71, 196, 1915.

Messerli: Über die Resorptionsgeschwindigkeit der Eiweiße und ihrer Abbauprodukte im Dünndarm. Diese Zeitschr. 54, 446, 1913.

Orlow: Einige Versuche über Resorption in der Bauchhöhle. Arch. f. d. ges. Physiol. 59, 170, 1895.

Overton: Über den Mechanismus der Resorption und der Sekretion. Nagels Handb. d. Physiol. 2.

Recklinghausen, v.: Zur Fettresorption. Virchows Arch. 26, 172, 1863.

Roth: Über die Permeabilität der Capillarwand und deren Bedeutung für den Austausch zwischen Blut und Gewebeflüssigkeit. Arch. f. Anat. und Physiol. Physiol. Abt. 1899, 416.

Salkowski: Praktikum d. physiol. und pathol. Chem. 4. Aufl. S. 287.

Starling und Tubby: zit. nach Hamburger.

Wegner: Arch. f. klin. Chir. 20, 84, 1877.

Eine neue Methode zur Prüfung der Phagocytose.

Von

Dr. Helwig.

(Aus dem Institut für pharmakolog. u. physiol. Chemie der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 3. April 1917.)

Für die Prüfung der Stärke phagocytärer Vorgänge stehen uns bislang zwei Methoden zur Verfügung: das Wrightsche Verfahren mit Bakterien und dasjenige von Hamburger mit Kohlepartikelchen als Titer. In jahrelangen Versuchen gelegentlich meiner Studien über die Wirkung der Kieselsäure auf die Phagocytose¹⁾ habe ich beide Methoden, insonderheit die Wrightsche angewandt.

Die Hamburgerische Kohlepartikelchen-Methode vermochte ich nicht beizubehalten, weil im Tierversuch die durch Zentrifugierung gewonnenen Zellrasen unangenehm zusammenkleben, es außerdem schwer fällt und beim jungen Tier faktisch unmöglich ist, wochenlang täglich entsprechend große Blutmengen zu entnehmen, ohne die Gesundheit der Tiere und damit die Zuverlässigkeit der Untersuchungen zu gefährden, für mein weiter unten geschildertes Entnahmeverfahren die Methode wegen der störenden roten Blutkörperdeckung die Untersuchung stark erschwert.

Das Wright-Verfahren, das meinen ersten Veröffentlichungen zugrunde liegt, ist so außerordentlich kompliziert und gibt technisch bei großen Versuchsreihen schon in der Herstellung der Lösungen und Präparate auch bei ausreichender Übung so große Fehlerquellen (nach Hamburger etwa 20%),

¹⁾ Veröffentlichungen der Zentralstelle für Balneologie, Jahrgang 8, Nr. 5/6, sowie Zeitschrift für Balneologie.

daß ich auf Abänderung sinnen mußte, nachdem alle Versuche, dasselbe zu vereinfachen, noch weniger befriedigten.

Nach mancherlei Fehlschlägen konstruierte ich mir die folgende Methode, die bei allen Prüfungen genau eingehalten wurde.

Um das frisch entnommene Blut vor Gerinnung zu schützen, bedient man sich der Schüttelmethode mit Glasscherben oder der Behandlung mit Natriumcitrat-Lösung, die aber, weil die Phagocytose hemmend, mittels physiologischer Kochsalzlösung mehrfach ausgewaschen und zentrifugiert werden mußte. Stellt schon eine solche vielfache Vorbehandlung eine ziemliche Quälerei der Leukocyten dar, zu der bei Wright noch die Gefahren für ihre Form beim Ausstreichen selbst kommen, so hatte die Zentrifugierung meist ein Zusammenkleben der Leukocyten in der weißen Schicht derselben zufolge, was im Präparat die Zählung der Bakterien ungünstig beeinflusste.

Mir mußte daran liegen, das Blut möglichst frisch verarbeiten zu können. Da Natriumcitrat wegen seiner phagocytosehemmenden Eigenschaft nicht in Frage kam, wählte ich das Hirudin, das wirksame Extrakt des Blutegelschlundes, nachdem ich in mancherlei Vorversuchen hatte feststellen können, daß es die Freßfähigkeit der Zellen auch in stärkerer Konzentration nicht beeinflusst. Es werden also dem entsprechend vorbehandelten Tier aus einer Vene des rasierten und gründlich gereinigten Ohres etliche Tropfen Blut in ausgekochter Pipette entnommen, 4 Tropfen davon in eine sterile Schale getan, mit 1 Tropfen einer Hirudinlösung ($\frac{1}{100}$ g auf 1 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung), danach mit 1 Tropfen einer entsprechenden sterilen Kochsalzemulsion einer etwa 10 Stunden alten Staphylococcus-albus-Kultur mit Hilfe des gebogenen Glasstabes vorsichtig verrieben, etliche Male mit der Pipette zart durchgeblasen und in diese aufgesogen, die dann in der üblichen Weise am unteren Ende zugeschmolzen, 15 Minuten im Brutschrank bei Körpertemperatur verweilt. Wegen der Abhängigkeit der Tropfengröße von Form und Lumenweite der Pipette ist es notwendig, für die Entnahme der Hirudinlösung und des Blutes einerseits, für die Entnahme der Bakterienemulsion andererseits je eine besondere, für alle Versuche gleiche Pipette zu verwenden. Ein Tropfen auf Objektträger bzw. Deckglas gebracht, entsprechend abgestrichen und nach Lufttrocknung

gefärbt, bei 50kerziger Glühlampe ausgezählt und in erster Reihe die Gesamtzahl der Leukocyten, in einer zweiten Spalte die Anzahl der fressenden Zellen und in einer dritten die Zahl der aufgenommenen und am Rande in einer ganz bestimmten gleichen Zonenbreite liegenden Bakterien notiert.

Danach Feststellung des phagocytären und opsonischen Index in der üblichen Weise.

Zur Berechnung kommen nur gut umrandete und gefärbte Zellen, solche in dichten Knäueln bleiben unberücksichtigt. Entnahme, Ausstrich und Färbung sollten immer nur von der gleichen geübten Hand vorgenommen werden; jeder, der länger über Phagocytose gearbeitet hat, wird mir beipflichten, daß die Unterschiede in Dichte, Ausstrich und Färbung der einzelnen Präparate die Prozentzahlen hier und da verschieden gestalten, und daher nur Durchschnittswerte aus verschiedenen Einzelpräparaten desselben Falls Anspruch auf Glaubwürdigkeit haben (wozu noch die Art des Auszählens des einzelnen Forschers kommt, für welchen natürlich seine Werte „absolute“ sein müssen), weshalb in jedem Falle 400 Leukocyten zu je 100 auf 4 Deckgläsern bzw. 2×200 auf 2 Objektträgern zum Ausgleich etwaiger Fehlerquellen gezählt werden sollten.

Soweit ich übersehen kann, glaube ich mit der geschilderten Technik ein außerordentlich einfaches, zugleich nach Möglichkeit einwandfreies Verfahren zur Vornahme von Phagocytose-Prüfungen am Tier- bzw. Menschenkörper gefunden zu haben; allerdings stellt die Zählung bei der verstreuten Lage der Leukocyten hinsichtlich Mühe und Zeit größere Anforderungen an den Untersucher.

Weitere Prüfungen über den Ablauf der Phagocytose bei Infektionskrankheiten, wozu sich die Methode durch den Wegfall der sonst notwendigen komplizierenden „Normalfälle“ ganz besonders eignet, sollen die weitere Anwendbarkeit auch zu klinischen Untersuchungen prüfen. Daß sie zu Tierversuchen brauchbar ist, habe ich bereits festgestellt.

Diese Mitteilung hat den Zweck, die Methodik allgemein bekannt zu machen und dazu aufzufordern, sie allseitig zu prüfen. Der Bericht über meine eigenen Prüfungen erscheint demnächst.

Beiträge zur Lichtabsorption des Oxyhämoglobins.

Von

Paul Hári.

(Aus dem physiolog.-chem. Institut der Universität Budapest
[Direktor Paul Hári]).

(Eingegangen am 7. April 1917.)

Mit 3 Figuren im Text.

Die Absorption, die gemischtes Licht beim Durchtritt durch Lösungen von Blut resp. Hämoglobin und seiner Derivate in gewissen Spektralbezirken erleidet, wurde nach verschiedenen Methoden geprüft.

Zuerst waren es bloß spektrometrische Untersuchungen, mittels deren Lage und Grenzen der charakteristischen Absorptionsstreifen festgestellt werden sollten. Später wurde durch Vierordt¹⁾ die Spektrophotometrie in die physiologische Forschung eingeführt, hatte jedoch erst in Hüfners Hand einen gewissen Grad der Vollkommenheit erlangt.

Hüfners und seiner Schüler Streben ging dahin, gewisse, die Lichtabsorption des Hämoglobins betreffende Konstanten festzustellen, mittels deren eine möglichst genaue quantitative Bestimmung ermöglicht würde; denn einer solchen Methode bedurfte Hüfner in seiner heute bereits von den meisten Autoren anerkannten Arbeit über die Sauerstoffkapazität des Hämoglobins.

Die Aufgabe, die ich mir stellte, war:

¹⁾ Karl Vierordt, Die Anwendung des Spektralapparates zur Photometrie der Absorptionsspektren und zur quantitativen chemischen Analyse, Tübingen 1873, und: Die quantitative Spektralanalyse in ihrer Anwendung auf Physiologie, Chemie und Technologie, Tübingen 1876.

1. Die Lichtabsorption des Oxyhämoglobins längs eines möglichst ausgedehnten Bezirkes des sichtbaren Spektrums spektrophotometrisch zu bestimmen;

2. die von mehreren Seiten stark angefochtenen Angaben Hüfners einer erneuten Prüfung zu unterwerfen, u. zw. sollte der Kontrolle halber hierzu ein anderes als das von Hüfner konstruierte und verwendete Spektrophotometer benutzt werden;

3. die Lage der Maxima und des Minimums der Lichtabsorption im Bereich der charakteristischen Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins auf spektrophotometrischem Wege festzustellen; um so mehr, als dies in den letzten Jahren wiederholt auch auf photographischem Wege und mit vielem Erfolge vorgenommen wurde¹⁾.

A. Versuchseinrichtung.

Da die Beurteilung spektrophotometrischer Versuche unmöglich ist, wenn nicht alle Versuchsbedingungen möglichst genau angegeben sind, will ich in nachstehendem auf alle Gesichtspunkte, die im Gebrauch des Apparates, wie auch in der Ausführung der Versuche wichtig erscheinen können, näher eingehen.

Zu den spektrophotometrischen Bestimmungen bediente ich mich eines Königschen Spektrophotometers von Schmidt und Haensch, das im Jahre 1902 bereits im Inventarium des physiologisch-chemischen Instituts sich befunden hatte. Es ist dies ein Instrument, das von König in der ersten Ausführung²⁾ im Jahre 1885 angegeben, im Jahre 1886 technisch verbessert³⁾ und im Jahre 1894 weiter vervollkommenet und ausführlich beschrieben wurde⁴⁾.

¹⁾ L. Lewin, A. Miethe und E. Stenger, Über die durch Photographie nachweisbaren spektralen Eigenschaften der Blutfarbstoffe etc. Arch. f. d. ges. Physiol. 118, 1907. W. Heubner und H. Rosenberg, Photographische Bestimmung der Intensitätsverteilung in Blutspektren, diese Zeitschr. 38, 1912. O. Schumm, Untersuchungen über die Absorptionerscheinungen des Oxyhämoglobins im Gitterspektrum. Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 1913.

²⁾ A. König, Über ein neues Spektralphotometer. Verhdlg. d. physik. Ges. in Berlin 4, 50, 1885.

³⁾ A. König, Über ein neues Spektralphotometer. Ebd. 5, 49, 1886.

⁴⁾ A. König, Ein neues Spektralphotometer. Annal. d. Physik. Neue Folge 53, 785, 1894.

Als Lichtquelle diente Auerlicht, das durch eine Mattglasscheibe trat; die Entfernung der Mattglasscheibe vom Eintrittspalt betrug 11 cm.

Justierung. Bevor ich den Apparat in Gebrauch nahm, mußte er genau justiert werden. Zu diesem Behufe wurde nach Königs Vorschrift¹⁾ der analysierende Nicol abgenommen, auch der Okularspalt entfernt und über das Okularrohr eine Lupe geschoben. Nun wurde bei Natriumlicht und einem Eintrittspalt von 0,015 mm erst das Rochonsche, dann das Zwillingsprisma so lange gedreht, bis die beiden Spaltbilder zur genauen Deckung kamen.

Es sei mir gestattet, Herrn Universitätsdozenten Dr. Stephan Rybár, der mir bei der Justierung des Königschen Spektrophotometers so manchen wertvollen Rat erteilte, an dieser Stelle bestens zu danken.

Kalibrierung. Besondere Sorgfalt erheischt die Kalibrierung der Orientierungsskala, mittels deren die jeweilig gewünschte Spektralstelle eingestellt wird. Die hierzu notwendigen Spektrallinien wurden teils durch Geißlersche Röhren (Wasserstoff, Helium, Quecksilber enthaltend) erzeugt, teils durch die Flammenspektren von Natrium, Lithium, Thallium, Strontium. Zunächst wurde Natriumlicht erzeugt und bei einem Eintrittspalt von 0,015 mm, möglichst engem Okularspalt, und aufgesetzter Lupe das Okularrohr mittels der Mikrometerschraube so lange verschoben, bis die Spektrallinie im Okularspalt erschienen war. Nun wurde an der Mikrometerschraube erst in der einen, dann in der entgegengesetzten Richtung so lange gedreht, bis die Spektrallinie bald am linken, bald am rechten Rand des Gesichtsfeldes (das durch die Backen des Okularspaltes begrenzt wird) eben verschwand und die betreffenden Stellen der Orientierungsskala notiert. Der mittlere Abstand zwischen beiden Stellen gab diejenige Stelle der Orientierungsskala an, bei der die Spektrallinie des Natriums genau die Mitte des Okularspaltes, also auch des Gesichtsfeldes eingenommen hatte.

Auf dieselbe Weise wurde der Reihe nach mit den übrigen Flammen- und Funkenspektren vorgegangen, nur mußte der

¹⁾ l. c. 1894.

Eintrittspalt etwas breiter genommen werden. Die so ermittelten Werte der Orientierungsskala wurden in ein Koordinatensystem als Abszissen, die entsprechenden Wellenlängen als Ordinaten eingetragen; zwischen den so erhaltenen Punkten

Tabelle I¹⁾.

1	2	3 11. IX. 916	4	5 16. IX. 916	6	7 20. IX. 916.	
Lithium	671	—				1085—1097 1084—1096 1085—1097	1091
Helium rot . .	667,8	1089—1098 1090—1098	1094	1089—1100	1094	1088—1098 1088—1098	1093
Wasserstoff rot	656,3	1095—1104 1095—1104	1100	—		1094—1105 1094—1105	1100
Natrium	589,3	1150—1159 1150—1159	1155	1150—1160 1150—1160	1155		
Helium gelb . .	587,6	1152—1161 1152—1159	1156	—	—	1150—1161 1150—1161	1156
Quecksilber grün	546,1	—	—	—	—	1196—1205 1195—1205 1195—1205 1195—1206	1200
Thallium	535	—	—	—	—	1208—1219 1210—1220 1208—1220	1214
Helium grün . .	501,6	1261—1270 1261—1270	1265	—	—	1261—1270 1260—1270 1259—1270	1265
Helium blaugrün	492,1	1276—1285 1276—1286	1281	—	—	1275—1286 1275—1286	1281
Wasserstoff blau	486,1	1288—1296 1288—1297	1292	—	—	1286—1297 1286—1297	1291
Helium blau . .	471	1317—1326 1317—1326	1322	—	—	1316—1327 1315—1326	1321
Strontium blau	461	—	—	—	—	1339—1348 1339—1350 1339—1350	1344
Helium violett .	447,2	—	—	—	—	1372—1384 1372—1383	1378

¹⁾ In Tabelle I sind in den Stäben 3, 5 und 7 die Stellen der Orientierungsskala angegeben, bei der die Spektrallinien am rechten resp. am linken Rand des Okularspaltes verschwinden; die Werte im Stab 4, 6 und 8, berechnet aus den erstgenannten, geben die Stellen der Orientierungsskala an, auf die eingestellt, die betreffende Spektrallinie genau die Mitte des Okularspaltes einnehmen würde.

wurde eine Kurve gezogen, und dann für jede Wellenlänge, bei der untersucht werden sollte, die entsprechende Stelle der Orientierungsskala durch Projektion auf die Abszisse erhalten.

Da die durch Spektrophotometrie ermittelten Werte der Lichtabsorption nur dann eindeutig sind, wenn eine Gewähr dafür geleistet wird, daß tatsächlich bei der angegebenen Wellenlänge untersucht wurde, mußte die Kalibrierung mit besonderer Sorgfalt vorgenommen und die Ablesungen mit den meisten der gewählten Spektrallinien wiederholt ausgeführt werden.

Die hieraus bezüglichen Daten seien in vorstehender Tabelle I mitgeteilt.

Nun kommt es jedoch nicht nur darauf an, daß die wenigen, durch die entsprechenden Spektrallinien gesicherten Teile der Orientierungsskala gut geeicht seien; dieselbe Genauigkeit ist auch für die dazwischenliegenden Stellen erforderlich, denn bei Untersuchungen am Blutfarbstoff kommen hauptsächlich solche in Betracht. Darum habe ich die Kurve zwischen den auf obige Weise erhaltenen Punkten wiederholt selbst gezogen und zum Überfluß noch durch Herrn cand. ing. Kornfeld — dem ich hierfür an dieser Stelle danke — ziehen lassen. Das Ergebnis war, daß für die wichtigsten in Betracht kommenden Wellenlängen aus meinen und Herrn Kornfelds Kurven beinahe identische Punkte der Orientierungsskala durch Projektion auf die Abszisse erhalten wurden.

$\mu\mu$	Orientierungsskala	
	(Kornfeld)	(Hári)
565,8	1177	1177,5
555,9	1188	1188,5
541,6	1206	1205,5
533,1	1216	1216,5

Eine weitere Kontrolle der Richtigkeit der Kurve ergab sich auf folgende Weise: Bekanntlich wurde in physiologischen Abhandlungen bis etwa 1885 die Lage von Spektrallinien und Absorptionstreifen in der Regel nicht in Wellenlängen angegeben, wie dies Valentin¹⁾ bereits im J. 1882 vorgeschlagen

¹⁾ G. Valentin, Histologische und physiologische Studien, 22. Mitteilung, Zeitschr. f. Biol. 18, 178, 1882.

hatte, sondern nach Vierordt¹⁾ längs des ganzen Spektrums die Entfernung zwischen je zwei — bekanntlich in verschiedenen Abständen voneinander entfernten — Fraunhoferschen Hauptlinien in je 100 Teile eingeteilt und die anzugebende Spektralstelle z. B. mit *B 22 C*, *C 15 D*, *D 19 E* usw. bezeichnet. Um Spektralstellen, die in diesem Maßstab angegeben sind, in Wellenlängen umwerten zu können, hat Vierordt²⁾ eine Tabelle angegeben, aus der für die zwischen je zwei Fraunhoferschen Linien gelegenen Stellen 10, 20, 30 bis 90 die Wellenlängen ohne weiteres abzulesen, für die dazwischenliegenden Stellen aber durch einfache Interpolation zu erhalten sind. (Tabellen, die, wie die von H. Krüss und P. Krüss³⁾, so ausgeführt sind, daß jeweils nur für die Fraunhoferschen Hauptlinien die richtigen Wellenlängen eingetragen, für die dazwischenliegenden Stellen aber die Wellenlängen einfach interpoliert sind, haben natürlich für diesen Zweck keinen Wert.) Ich habe nun die in älteren Arbeiten, besonders Hüfners und seiner Schüler (in der Tabelle V auf S. 256) figurierenden Angaben der alten Ausdrucksweise einerseits mit Hilfe der Vierordtschen Tabellen in Wellenlängen umgewertet, andererseits die entsprechenden Wellenlängen mit Hilfe des Koordinatensystems, in das meine Kurve eingetragen war, durch Konstruktion erhalten.

	Nach der Vierordtschen Tabelle, $\mu\mu$	Aus meiner Kurve, $\mu\mu$
<i>D 32 E</i>	566,5	566,5
<i>D 53 E</i>	553,4	553,0
<i>D 54 E</i>	552,8	552,7
<i>D 63 E</i>	547,3	547,4
<i>D 79 E</i>	538,2	538,0
<i>D 84 E</i>	535,6	535,4

Wie ersichtlich, ließ die Übereinstimmung nichts zu wünschen übrig; ich konnte also auf Grund der doppelten Kon-

¹⁾ Karl Vierordt, Die Anwendung des Spektralapparates zur Messung und Vergleichung der Stärke des farbigen Lichtes, Tübingen 1871.

²⁾ l. c. 1876, 104.

³⁾ Hugo Krüss und Paul Krüss, Colorimetrie und quantitative Spektralanalyse in ihrer Anwendung in der Chemie. Hamburg und Leipzig II. Aufl., 1909, 279.

trolle dessen sicher sein, daß die Kalibrierung eine genaue war, und daß die Ablesungen tatsächlich bei den gewünschten Wellenlängen erfolgt sind.

Einstellung des Okularspaltes. Es ist klar, daß, wenn an verschiedenen Stellen eines prismatischen Spektrums durch den Okularspalt Spektralbereiche von derselben Wellenlängenbreite abgegrenzt werden sollen, der Okularspalt in der Richtung von Rot nach Violett immer breiter genommen werden müßte, resp. bei unverändertem Okularspalt der Spektralbereich, der im Gesichtsfeld erscheint und auf einmal überblickt wird, von Rot nach Violett immer schmaler und schmaler wird. Nun ist aber an meinem Apparat der Okularspalt wohl symmetrisch, jedoch mangels einer Meßtrommel nicht meßbar verstellbar, und wollte ich Hüfners Untersuchungen, die in zwei ganz genau umschriebenen Spektralbereichen stattfanden, genau nachprüfen, so wäre ich eigentlich bemüßigt gewesen, den Okularspalt für jede einzelne Bestimmung frisch einzustellen. Dies war, bei dem erwähnten Fehlen einer Meßtrommel, einfach technisch unmöglich. Darum mußte ich mich damit begnügen, den Okularspalt so breit zu nehmen, daß der Spektralausschnitt in dem wichtigen Gebiete der Absorptionsstreifen ungefähr den von Hüfner in seinen späteren Arbeiten, resp. von Butterfield verwendeten Wellenlängenbereich entspreche, und diese Okularspaltbreite ein für allemal beibehalten.

Allerdings ergab sich hieraus der Nachteil, daß bei den Untersuchungen in Rot resp. in Blau der Spektralausschnitt ein abnorm weites resp. enges Wellenlängengebiet umfaßte; bei der geringeren Wichtigkeit der Ablesungen in Rot und Blau spielt jedoch dies keine besondere Rolle.

Eintrittsspalt. Der Eintrittsspalt wurde für alle Versuche (mit Ausnahme der Kalibrierungsversuche) 0,1 mm breit genommen.

Konstante Temperatur der Farbstofflösung. Die zu untersuchende Lösung wurde in den Absorptionstrog, der den Schulzschen Körper enthielt, unter peinlicher Vermeidung von Luftblasen eingefüllt; der Trog stand knapp vor dem Eintrittsspalt.

Es mußte sorgfältig verhütet werden, daß die im Trog befindliche Flüssigkeit während der Untersuchung durch das

hindurchtretende Lichtbündel erwärmt werde; den störenden Einfluß der Erwärmung, die, außer von H. Krüss und P. Krüss¹⁾ von den Autoren kaum erwähnt wird, hatte ich in folgendem Versuche erfahren müssen. Es wurden in einem ausgedehnteren Spektralgebiet Ablesungen in zwei Absätzen gemacht, so zwar, daß erst jede zweite Stelle der Orientierungskala eingestellt wurde, dann nach einer kurzen Pause die dazwischen liegenden Stellen. Auf diese Weise erhielt ich folgende nach S. 237 berechnete Extinktionskoeffizienten:

Die ersten 10 Ablesungen ergaben:		Die zweiten 10 Ablesungen ergaben:	
bei 546,0	0,750	bei 545,2	0,754
„ 544,4	0,798	„ 543,6	0,784
„ 542,8	0,822	„ 542,0	0,808
„ 541,2	0,844	„ 540,4	0,829
„ 539,6	0,839	„ 538,8	0,814
„ 538,0	0,829	„ 537,2	0,800
„ 536,5	0,805	„ 535,8	0,789

Es ergab sich demnach, daß bei den späteren Ablesungen die Werte kleiner ausgefallen waren, als der Reihenfolge im linken Stab entsprach, so daß die Werte des rechten Stabes links nirgends hineinpassen, wo doch an einem regelmäßigen Gang (Zu- und Abnahme) der Absorption nicht zu zweifeln war.

Ich suchte nach der Ursache dieser Erscheinung und fand sie durch folgenden Versuch geklärt: ich füllte die Blutlösung ein, stellte das Okularrohr auf eine bestimmte Stelle der Skala ein und machte nun in kurzen Zeitabständen, ohne das Okularrohr zu verrücken, Ablesungen, wobei jedesmal die Temperatur der Blutlösung gemessen wurde. Dabei ergab sich, daß der Winkel, bei dem gleiche Helligkeit der Gesichtsfeldhälften erreicht war, sich mit steigender Temperatur der Flüssigkeit folgendermaßen änderte:

¹⁾ l. c. 199 und ff.

1.	Ableseung	19,6 ⁰	(in der Lösung)	15 ⁰ 33'
2.	"	21,3 ⁰	" " "	15 ⁰ 45'
3.	"	22,6 ⁰	" " "	16 ⁰ 02'
4.	"	23,0 ⁰	" " "	16 ⁰ 12'

Da mit zunehmendem Winkel der Wert des Extinktionskoeffizienten abnimmt, war die Ursache der oben erörterten Unstimmigkeit gefunden.

Für die ferneren Untersuchungen hatte ich daher zwischen Lampe und Absorptionstrog zwei Kuvetten mit planparallelen Glaswänden geschaltet und mit destilliertem Wasser angefüllt; das Wasser in der der Lampe näher gelegenen Kuvette hatte sich im Verlaufe einer längeren Beobachtungsserie um 4 bis 7⁰ erwärmt, das der zweiten Kuvette um 2 bis 3⁰; die Temperatur der Farbstofflösung jedoch hatte sich, wie ich mich fürderhin bei jeder Untersuchung überzeugt habe, auch bei längerer Beobachtungsdauer höchstens um etwa 1⁰ verändert.

Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten. Der Extinktionskoeffizient ε wird beim Gebrauch eines Königschen Spektrophometers auf Grund der folgenden Formel berechnet:

$$\varepsilon = - \left[\log \operatorname{tg}^2 \beta - \log \frac{1}{\operatorname{tg}^2 \alpha} \right],$$

wobei man mit β , resp. α denjenigen von der Nullstellung berechneten Stand des Nikols bezeichnet, bei dem die beiden übereinander stehenden Hälften des Gesichtsfeldes gleich hell erscheinen; und zwar gilt β für die zu untersuchende Lösung, α für das reine Lösungsmittel.

Die Ablesungen wurden erst an der Lösung in allen 4 Quadranten vorgenommen, dann die ganze Runde noch zweimal wiederholt, und zum Schluß von den insgesamt 12 Ablesungen der Mittelwert berechnet. Selbstverständlich wurden, wenn die Ablesungen in den 4 Quadranten x_1 , x_2 , x_3 und x_4 lauteten:

im rechten oberen Quadranten	x_1
" " unteren	" 180 — x_2
" linken	" x_3 — 180
" " oberen	" 360 — x_4

in Rechnung gebracht.

Sodann wurde in den auf das sorgfältigste gereinigten Trog, der den Schulzschen Körper enthielt, das Lösungsmittel eingefüllt und α auf die oben geschilderte Weise ermittelt.

Durch das Korrektionsglied $\log \frac{1}{\text{tg}^2 \alpha}$ werden am Königschen Spektrophotometer folgende 2 Fehler kompensiert. Beim Durchgang durch das Rochonsche und durch das Zwillingsprisma werden die beiden, durch die obere, resp. durch die untere Hälfte des Eintrittspaltes eingetretenen Lichtbündel in je 4 Bündel zerlegt, von denen jedoch infolge einer entsprechenden Abblendevorrichtung bloß je einer in das beobachtende Auge gelangt. Diese beiden Strahlenbündel sind senkrecht aufeinander polarisiert und werden demzufolge beim Durchtritt durch das Dispersionsprisma eine verschieden starke Schwächung erfahren.

Dieser verschieden starken Schwächung ist es zuzuschreiben, daß, auch wenn keine absorbierende Flüssigkeit zwischen Lichtquelle und Apparat geschaltet ist, gleiche Helligkeit der beiden Gesichtsfeldhälften, z. B. im rechten oberen Quadranten nicht bei der Nullstellung des analysierenden Nikol erreicht ist, sondern an meinem Apparat bei etwa 36° .

Eine zweite Schwächung erfahren beide Lichtbündel durch die Reflexion, die sie an den Grenzflächen Luft-Glas, Glas-Flüssigkeit am Absorptionstrog erleiden, die aber für beide Strahlen wieder ungleich ausfallen wird, da ja der untere Strahl überdies noch eine weitere Reflexion an der vorderen und hinteren Fläche des Schulzschen Körpers erfährt¹⁾. Von dieser ungleichmäßigen Schwächung der beiden Strahlen kann man sich überzeugen, wenn man den Absorptionstrog mit einer nicht oder wenig absorbierenden Flüssigkeit, z. B. mit destilliertem Wasser oder mit einer sehr stark verdünnten Farbstofflösung anfüllt, und dann einmal ohne den Schulzschen Körper, und ein zweites Mal, nachdem man denselben wieder eingesetzt hat, abliest. Aus den abgelesenen Winkeln ergibt sich dann nach der oben angegebenen Formel ein Extinktionskoeffizient, der einen negativen Wert hat, was natürlich ein Ding der Unmöglichkeit ist. So erhielt ich z. B. an destilliertem Wasser

	ohne den	mit dem
	Schulzschen Körper	Schulzschen Körper
bei $532,8 \mu\mu$ für α . . .	$36^\circ 03'$	$36^\circ 31'$
" $556,3$ " " β . . .	$36^\circ 22'$	$36^\circ 57'$
hieraus $\varepsilon = -\log \frac{\text{tg}^2 \beta}{\text{tg}^2 \alpha} =$	$-0,0148$ ($532,8 \mu\mu$)	resp. $-0,0185$ ($556,3 \mu\mu$)

	ohne den	mit dem
	Schulzschen Körper	Schulzschen Körper
bei $648,8 \mu\mu$ für α . . .	$37^\circ 18'$	$37^\circ 18'$
" $641,7$ " " β . . .	$37^\circ 51'$	$37^\circ 45'$
hieraus $E = -\log \frac{\text{tg}^2 \beta}{\text{tg}^2 \alpha} =$	$-0,0177$ ($648,8 \mu\mu$)	resp. $-0,0141$ ($641,7 \mu\mu$)

¹⁾ Siehe auch H. Krüss und P. Krüss, l. c. S. 191.

Die beiden Strahlen erfahren demnach eine doppelte Schwächung, die aber verschieden stark ist; um den hierdurch bedingten Fehler zu korrigieren, wird der Winkel α ermittelt, und zwar wenn der Absorptionstrog bei eingesetztem Schulzschens Körper mit dem reinen Lösungsmittel angefüllt ist.

Natürlich ist auch diese Kompensation keine vollkommene; denn die Unterschiede in der Schwächung beider Strahlen, erst infolge der Reflexion an den Flächen des Schulzschens Körpers, dann beim Durchtritt durch das Dispersionsprisma müssen nicht notwendigerweise dieselben sein, ob es sich um das farblose Lösungsmittel oder um die gefärbte Lösung handelt.

Ich muß ausdrücklich bemerken, daß es ein grober Fehler gewesen wäre, das Korrektionsglied $\log \frac{1}{\text{tg}^2 \alpha}$ für das Lösungsmittel ein für allemal feststellen zu wollen. Denn der Wert von α hängt nicht nur von der chemischen Natur, Konzentration, Temperatur des Lösungsmittels ab, sondern auch von der Intensität des durchtretenden Lichtes (Beschaffenheit des Glühstrumpfes des Auerbrenners, Gasdruck usw.), Temperatur der lichtdurchlässigen Bestandteile des Apparates und der untersuchten Flüssigkeit usw. Allerdings werden ja alle Vorkehrungen getroffen, um die genannten Versuchsbedingungen immer womöglich gleich zu gestalten; doch ist dies über einen gewissen Grad hinaus nicht möglich. Es ist mir wiederholt vorgekommen, daß eine Lösung von Blutfarbstoff einmal am Morgen, ein zweites Mal einige Stunden später untersucht, wesentliche Unterschiede in den abgelesenen Winkeln β aufwies; da jedoch auch in den Winkeln α entsprechende Unterschiede (am Lösungsmittel) vorhanden waren, fielen die berechneten Extinktionskoeffizienten gleich groß aus.

Ferner darf nicht vergessen werden, daß der Winkel α je nach der Wellenlänge, bei der abgelesen wird, einen verschiedenen Wert hat. Soll also der Extinktionskoeffizient bei zwei verschiedenen Wellenlängen, wenn auch hintereinander während einer kurzen Spanne Zeit, bestimmt werden, so genügt eine einmalige Ablesung von α am Lösungsmittel nicht; vielmehr muß derselbe bei beiden Wellenlängen bestimmt werden.

In meinen weiter unten mitzuteilenden Versuchen geschah dies auch immer; mit Ausnahme der Serienuntersuchungen, in denen fortlaufend an jeder, oder jeder zweiten Stelle der Orientierungsskala, also in Intervallen von höchstens 1 bis

2 $\mu\mu$ abgelesen wurde. In diesen Fällen durfte ich mich darauf beschränken, α in größeren Intervallen (von etwa 7 bis 8 $\mu\mu$) zu bestimmen; war übrigens auch gezwungen dies zu tun, da solche Serienuntersuchungen ohnehin immer stundenlang sich hinzogen.

Das Untersuchungsmaterial. Untersucht wurde der Carotis lebender Hunde frisch entnommenes und sofort defibriniertes Blut, und aus diesem bereitetes Oxyhämoglobin; ferner frisch vom Schlachthof bezogenes defibriniertes Pferdeblut (einmal Schweinsblut) und aus diesem bereitetes Oxyhämoglobin.

1. Aus dem Blute wurde zunächst eine konzentrierte Stammlösung durch Verdünnen mit destilliertem Wasser oder mit einer 0,1 %igen Lösung von kohlensaurem Natrium bereitet und diese Stammlösung teils in konzentriertem Zustande, teils nach weiterer Verdünnung mit einer 0,1 %igen Lösung von kohlensaurem Natrium untersucht. Die Verdünnungen wurden mittels genau kalibrierter Pipetten und Meßkolben hergestellt und ihr Hämoglobingehalt auf spektrophotometrischem Wege mittels der (S. 242) zu besprechenden Konstanten festgestellt.

2. Oxyhämoglobin aus Hunde- und Pferdeblut wurde nach den allbekanntesten Vorschriften¹⁾ krystallinisch dargestellt.

Oxyhämoglobinlösungen von genau gekanntem Inhalt wurden, da krystallisiertes Oxyhämoglobin nicht getrocknet werden kann, ohne wesentliche Veränderungen auch in seinem optischen Verhalten zu erleiden, nach der bekannten Vorschrift folgendermaßen hergestellt. Von dem frisch abgenutzten und dann in einem Mörser sorgfältig durchkneteten Krystallbrei wurden 3 bis 6 g in einem Wägegläschen mit eingeschliffenem Glasstöpsel auf der analytischen Wage genau abgewogen und hieraus Stammlösungen von 1 bis 3 % Gehalt mittels einer 0,1 %igen Lösung von kohlensaurem Natrium bereitet.

Der Hämoglobingehalt der Stammlösung ergab sich aus dem Volum der Lösung und dem Trockengehalt des aufgelösten Krystallbreies. Um diesen zu bestimmen, wurden 1 bis 1,5 g des Krystallbreies in einem Wägegläschen mit eingeschliffenem Glasstöpsel genau gewogen und zunächst im Dampftrocken-

¹⁾ K. Bürker in Tigerstedts Handbuch der physiol. Methodik 2.1, 93.

schränk getrocknet, dann 24 Stunden lang offen im Zimmer stehen gelassen und wieder genau gewogen. Nun wurde der spröde Rückstand fein pulverisiert, 0,50 bis 0,80 g des Pulvers gewogen und im Vakuumtrockenschrank bei 60 bis 70° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ich habe mich davon überzeugt, daß durch das anfängliche Erhitzen des feuchten Breies im Dampftrockenschrank, wo ein verschiedener Anteil des Hämoglobins vor dem Eintrocknen koaguliert sein dürfte, die Genauigkeit der Trockengehaltsbestimmung (etwa durch intramolekulare Wasseraufnahme) keinen Abbruch erlitten hat. Es wurden nämlich in mehreren Versuchsreihen 2 Proben (a) des Krystallbreies erst im Exsiccator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur und dann im Vakuumtrockenschrank, dann bei 60 bis 70° getrocknet; 2 andere Proben (b) desselben Krystallbreies wurden erst im Dampftrockenschrank und nachher im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Das Ergebnis war an allen 4 Proben nahezu dasselbe.

Auch Butterfield¹⁾ bemerkt, daß das Trocknen im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure und in einer H-Atmosphäre bei 110° zu demselben Resultat geführt hatte.

Im übrigen hatte auch Hüfner dasselbe Resultat erhalten, ob er die Konzentration seiner Lösungen aus dem Trockengehalt des aufgelösten Krystallbreies berechnete oder durch Eindampfen der fertigen Lösung bestimmte.

Die weiteren soda-alkalischen Verdünnungen wurden, wie am Blute, mittels genau kalibrierter Pipetten und Meßkolben hergestellt.

In vielen Versuchsreihen wurde die zur Auflösung bestimmte Menge des krystallisierten Hämoglobins nur ungefähr gewogen und der Hämoglobingehalt der verdünnten Lösung auf spektrophotometrischem Wege mit Hilfe der (S. 242) zu erörternden Konstanten bestimmt.

In den Tabellen II, III und IV ist die Art der Bestimmung des Hämoglobingehaltes der untersuchten Lösung bei den Prozentwerten als „gew.“ (durch Wägung des Krystallbreies) oder „spektr.“ (spektrophotometrisch bestimmt) verzeichnet.

Die Konzentration der Lösungen mußte, da die Lichtabsorption in verschiedenen Spektralbezirken eine sehr ver-

¹⁾ E. E. Butterfield, Über die Lichtextinction, das Gasbindungsvermögen und den Eisengehalt des menschlichen Blutfarbstoffs in normalen und krankhaften Zuständen. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* 62, 195, Anmerkung.

schiedene ist, diesem jeweilig angepaßt werden: bei den Untersuchungen in Rot konnten noch Lösungen von 1 bis 3⁰/₀ Hämoglobingehalt scharf eingestellt werden, hingegen im Bereich der beiden Absorptionsstreifen sowie auch in Blau bloß solche bis 0,3⁰/₀.

Die fertigen Lösungen wurden, soweit in den betreffenden Tabellen das Gegenteil nicht ausdrücklich hervorgehoben ist, im Eisschrank bei 2 bis 8⁰ verwahrt.

Quantitative Bewertung der Ergebnisse. Um die Lichtabsorption in den verschiedenen Spektralregionen ziffernmäßig bewerten und vergleichen zu können, hatte ich die Wahl, die Absorptionsverhältnisse (*A*) (Vierordt) zu berechnen, oder aber die Extensionskoeffizienten auf eine einheitliche Konzentration zu reduzieren, wie dies übrigens ebenfalls bereits durch Vierordt geschah. Da aber das Absorptionsverhältnis nichts anderes ist als der tausendfach verringerte, reziproke Wert des Extinktionskoeffizienten bei der von Vierordt gewählten Konzentration von 0,1⁰/₀, der Extinktionskoeffizient selbst aber mit der Absorption wächst und fällt, ist dieser auf dieselbe Konzentration von 0,1⁰/₀ berechnet, zur vergleichenden und graphischen Darstellung der Lichtabsorption eher geeignet. Daher habe ich diese Art der vergleichenden Berechnung vorgezogen und für alle Versuchsreihen durchgeführt.

Die auf eine 0,1⁰/₀ige Konzentration der Farbstofflösung berechneten Werte der Extinktionskoeffizienten will ich hierfür als spezifische Extinktionskoeffizienten bezeichnen; eine Ausdrucksweise, die sich für ähnlich reduzierte Werte vielfach bewährt und eingebürgert hat.

Die spezifischen Extinktionskoeffizienten der einzelnen Versuchsreihen habe ich in den Tabellen II, III und IV zusammengestellt und für jeden Spektralausschnitt auch die Mittelwerte aus allen Versuchsreihen berechnet. Der besseren Übersicht halber habe ich außerdem die Mittelwerte als Ordinaten in ein Koordinatensystem eingetragen, in dem die Wellenlängen¹⁾ als Abszissen figurierten (Fig. 1 bis 3). Die so entstandenen Kurven sollen den Gang der Lichtabsorption darstellen.

¹⁾ Als Wellenlänge wurde hier die mittlere Wellenlänge je eines Spektralausschnittes genommen.

Spektralbereich, in dem untersucht wurde. Die Absorption der Blut-, resp. der Oxyhämoglobinlösungen sollte längs einer womöglich ausgedehnten Spektralregion ausgeführt werden; natürliche Grenzen wurden derselben dadurch gesteckt, daß rotwärts von 648,8 $\mu\mu$ und violettwärts von 478,2 $\mu\mu$ bei der von mir benutzten Apparatur und Versuchseinrichtung eine einigermaßen scharfe Einstellung der beiden Gesichtsfeldhälften auf gleiche Helligkeit unmöglich war.

Die Abstände, in denen innerhalb eines Spektralbezirkes abgelesen wurde, richteten sich nach der Wichtigkeit der betreffenden Region; so wurde in Rot und Blau in größeren Abständen gemessen, hingegen im wichtigen Bereich der beiden Absorptionsstreifen in vielen Serien bei jeder durch den Nonius einstellbaren Stelle der Orientierungsskala.

B. Ergebnisse der Versuche.

I. Lichtabsorption im Rot. In allen Versuchsreihen wurden die Ablesungen innerhalb der ersten 2 Stunden nach Fertigstellung der Lösung vorgenommen. In drei Versuchsreihen konnten die Ablesungen rotwärts bis 648,8 $\mu\mu$ fortgesetzt werden, in den übrigen mußten sie infolge der Verdunkelung des Gesichtsfeldes vorher abgebrochen werden. Die spezifischen Extinktionskoeffizienten sind 10000fach vergrößert in Tabelle II eingetragen und in ihrer natürlichen Größe in Fig. 1 dargestellt.

Vergleicht man die in den einzelnen Versuchsreihen für denselben Spektralausschnitt gefundenen Werte, so ist die Übereinstimmung stellenweise recht gut, im allgemeinen annehmbar; allerdings mit Ausnahme der Versuchsreihe am Pferdeoxyhämoglobin Nr. 35, in der die Werte stark aus der Reihe der übrigen springen. Ob hier bereits eine Umsetzung des Blutfarbstoffes (S. 276) stattgefunden hat, oder aber ein Fehler in der Konzentrationsbestimmung unterlaufen ist, kann ich nicht angeben; jedenfalls habe ich bei der Berechnung der Mittelwerte diese Versuchsreihe unberücksichtigt gelassen.

Es ist ersichtlich (siehe auch Fig. 1), daß bereits am äußersten rotwärts gelegenen Rand des untersuchten Spektralgebietes eine Absorption sicher zu konstatieren ist; sie nimmt violettwärts erst langsamer, dann rascher zu. Die Absorption bei

Tabelle II.

Spezifische Extinktionskoeffizienten $\times 10^4$ in Rot bestimmt an soda alkalischen Lösungen von kristallisiertem Oxyhämoglobin aus Pferdeblut.

Spektral- ausschnitt	Nr. 35 Lösung ¹ 0,938 ^o / _o (spektr.) ¹⁾	Nr. 34 1,100 (gew.) ²⁾	Nr. 37 Lösung ² 1,375 (gew.)	Nr. 33 Lösung ³ 1,980 ^o / _o (spektr.)	Nr. 38 Lösung ³ 3,364 ^o / _o (gew.)	Nr. 41 3,561 ^o / _o (gew.)	Mittel- werte (ohne Nr. 35)
656,0—641,0	52,8	—	52,0	—	54,5	—	53,2
653,8—638,3	52,8	—	—	—	—	—	—
650,7—635,6	62,5	—	—	—	—	—	—
651,0—634,3	—	—	—	—	—	64,5	64,5
648,1—633,0	53,9	—	—	—	—	—	—
645,3—630,3	51,2	—	—	—	—	—	—
642,4—627,7	54,6	76,8	67,8	—	74,3	75,3	73,5
639,6—625,1	63,2	77,2	—	—	—	—	77,2
637,0—622,6	71,9	85,7	—	—	—	—	85,7
635,6—627,6	—	—	—	—	—	92,7	92,7
634,3—620,1	92,7	84,7	—	—	—	—	84,7
631,6—617,6	106	91,3	—	—	—	—	91,3
628,9—615,1	119	108	112	124	115	117	115
626,4—612,8	150	116	—	—	—	—	116
623,9—610,4	166	128	151	—	—	—	140
622,6—609,2	—	—	—	—	—	150	150
621,3—608,2	191	155	151	—	166	—	157
618,8—605,7	234	197	—	—	—	—	197
616,3—603,4	268	211	—	—	—	212	211
613,9—601,2	296	236	242	—	252	—	243
611,6—599,0	357	275	—	—	—	—	275
609,3—596,8	430	334	357	377	331	314	343

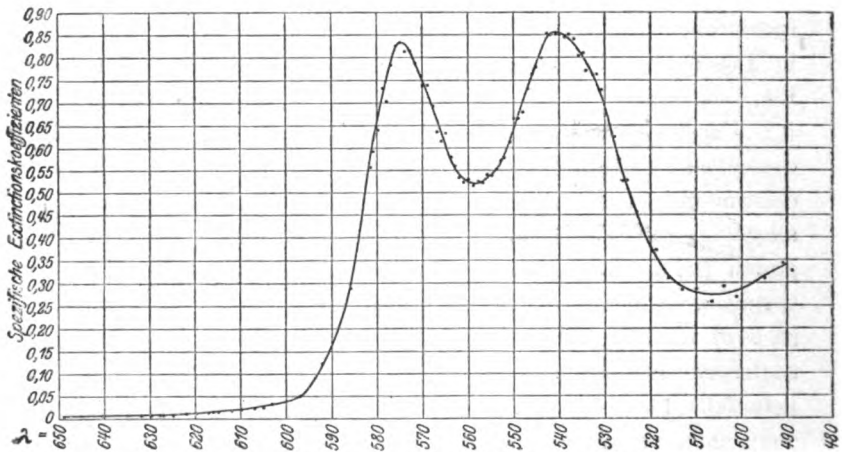


Fig. 1.

1) Konzentration (Volum-Gewichtsprozent) spektrophotometrisch bestimmt.

2) Konzentration durch Wägung des aufzulösenden Oxyhämoglobins bestimmt.

648,8 $\mu\mu$ ist zwar gering, doch noch gut meßbar; denn es darf nicht vergessen werden, daß die aus den Ablesungen unmittelbar berechneten Werte in Wirklichkeit zirka 10 bis 36 mal so groß waren, als sich nach der Reduktion auf 0,1% Hämoglobingehalt ergeben hat, und in die Tabelle eingetragen wurde.

So wurden z. B. an dem am wenigsten konzentrierten Hämoglobin Nr. 35, Lösung 1, bei 648,8 $\mu\mu$ wohl nur $35^{\circ}05'$ (Korrektionswinkel $\alpha = 36^{\circ}38'$) abgelesen und hieraus der Extinktionskoeffizient von 0,0495 unmittelbar berechnet, am Hämoglobin Nr. 38, Lösung 3 jedoch $31^{\circ}26'$ (Korrektionswinkel $\alpha = 37^{\circ}03'$) abgelesen, hieraus der Extinktionskoeffizient 0,1834 unmittelbar berechnet. Nur infolge der Reduktion auf 0,1% Gehalt sind aus beiden Werten 0,00528 und 0,00545 entstanden. Nur um a fortiori zu beweisen, habe ich diese Beispiele gewählt, in denen die Absorption am allergeringsten ist; an allen nächstfolgenden Stellen waren die Unterschiede zwischen den abgelesenen Winkeln und die Extinktionskoeffizienten rasch zunehmend größer.

II. Lichtabsorption in Blau. Hier wurden an stark verdünnten Lösungen gearbeitet und bloß wenige Ablesungen in größeren Intervallen ausgeführt. Wie aus nachstehender Tabelle III und Fig. 1 ersichtlich, nimmt die Absorption nach dem jähen Abfall von der Höhe des zweiten Absorptionsstreifens immer langsamer ab, um bald wieder allmählich anzusteigen.

III. Lichtabsorption im Bereiche der Absorptionsstreifen. Auch hier mußten selbstverständlich stark verdünnte Lösungen genommen werden. Den richtigen Grad der Verdünnung zu treffen, war aber nicht immer leicht; denn bei den jähen Übergängen zwischen weniger und stärker absorbierenden, relativ sehr nahe aneinander liegenden Spektralstellen, ist es nur allzu oft vorgekommen, daß die Ablesungen, die eine Strecke weit gut vor sich gingen, einige $\mu\mu$ weiter infolge allzu großer Dunkelheit des Gesichtsfeldes oder umgekehrt, weil die Winkelunterschiede zu gering waren, abgebrochen werden mußten. Nichtsdestoweniger ist es mir gelungen, das ganze Gebiet, wenn auch meistens absatzweise an verschiedenen Lösungen, durchzuprüfen. In Tabelle IV habe ich die spezifischen Extinktionskoeffizienten zusammengestellt und im letzten Stab die Mittelwerte berechnet; außerdem habe ich aus den Mittelwerten der spezifischen Extinktionskoeffizienten aller Versuchsreihen nach dem S. 242 erörterten Prinzip, eine Kurve der Lichtabsorption (Fig. 2) angefertigt.

Tabelle III.

Spezifische Extinktionskoeffizienten in Blau, an soda-alkalischen Blut- resp. Oxyhämoglobinlösungen.

Spektral- ausschnitt; $\mu\mu$	Hunde- blut 21	Hunde- blut 20 Lösung 3	Hunde- blut 20 Lösung 2	Pferde- hämoglobin 33 Lösung 6	Mittel- werte
	Hämoglobingehalt d. untersuchten Lösung; %				
	0,0244 (spektr.) ¹⁾	0,0426 (spektr.)	0,0853 (spektr.)	0,148 (spektr.)	
532,4—524,7	—	—	—	0,627	0,627
530,8—523,3	—	—	—	0,575	0,575
530,1—522,6	0,520	0,507	0,553	—	0,527
529,4—522,0	—	—	—	0,531	0,531
528,1—520,5	—	—	—	0,476	0,476
526,7—519,1	—	0,418	0,450	0,452	0,440
525,3—517,7	—	—	—	0,422	0,422
524,0—516,3	—	—	—	0,399	0,399
523,3—515,7	0,346	0,350	0,384	—	0,360
522,6—515,1	—	—	—	0,374	0,374
519,8—512,4	—	0,307	0,327	—	0,317
516,3—509,3	0,286	0,262	0,309	—	0,286
513,1—506,3	—	—	0,285	—	0,285
509,9—503,4	0,225	0,258	0,291	—	0,258
506,9—500,4	—	—	0,296	—	0,296
504,0—497,4	0,265	0,249	0,294	—	0,269
501,1—494,5	—	—	0,316	—	0,316
498,0—491,5	—	0,290	0,329	—	0,309
495,1—488,8	—	—	0,346	—	0,346
492,0—486,0	—	0,308	0,339	—	0,323

Die Kurve ist ganz ähnlich denen, die Heubner und Rosenberg aus ihren Photogrammen konstruierten, nur ist bei diesen Autoren die Anordnung der Wellenlängen längs der Abszisse, wie auch die der Extinktionskoeffizienten als Ordinaten eine inverse.

Bezüglich meiner Kurven soll hier folgendes bemerkt sein: Ein und dieselbe Farbstofflösung längs des ganzen Spektralbezirks, in dem Helligkeitsunterschiede noch scharf wahrnehmbar sind, durchzuprüfen, ist technisch beinahe ein Ding der Unmöglichkeit. Denn zunächst muß damit gerechnet werden, daß das Auge nach einer gewissen Zeit (in der Regel nach 1 bis 2 Stunden) ermüdet; es ist dies eine Müdigkeit, die nicht einmal so sehr subjektiv empfunden wird, als eher an der rasch zunehmenden Unstimmigkeit der Ablesungen in den vier Quadranten, resp. in den wiederholten Runden zu erkennen ist.

¹⁾ Konzentration (Volum-Gewichtsprozente) spektrophotometrisch bestimmt.

Ich konnte daher, mit Ausnahme einiger Reihen, die bei besonders guter subjektiver Disposition über einen ausgedehnten Spektralbereich hin fortgeführt wurden, die meisten Lösungen bloß in dem einen oder anderen relativ schmalen Bereich untersuchen.

Nun war jedoch bereits S. 240 erwähnt, daß die Herstellung einer Hämoglobinlösung von einer bekannten Konzentration durch Lösen der feuchten Krystalle ein ziemlich umständliches Verfahren ist, das Fehlerquellen in sich birgt; in anderen Versuchsreihen wurde die Konzentration auf spektrophotometrischem Wege mittels gewisser Konstanten (S. 242) bestimmt, die auch so manche Fehler haben. Alle diese Fehler müssen dann in den aus mehreren Versuchsreihen enthaltenen Mittelwerten zum Ausdruck kommen, wenn aus diesen eine Kurve konstruiert werden soll. Die stellenweise unregelmäßige Lagerung der Punkte machte es in Fig. 1 und 2 notwendig, die Kurve an diesen Stellen entsprechend ihrem wahrscheinlichen Verlauf, zwischen den Punkten, zu ziehen.

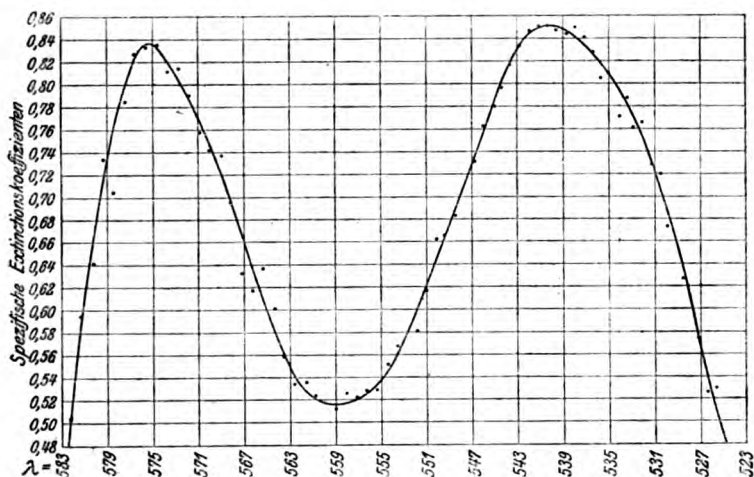


Fig. 2.

1. Breite der Absorptionsstreifen. Es wird von allen Autoren, die bloß spektroskopisch untersucht haben, angegeben, daß der erste Absorptionsstreifen weit schmaler ist als der zweite, in Grün gelegene. Nun könnte es wohl leicht der Fall sein, daß der zweite Streifen bloß darum breiter erscheint, weil das prismatische Spektrum violettwärts mehr gedehnt erscheint. In meinen Kurven kann von einer solchen Dehnung keine Rede sein, da ja die Wellenlängen in regelmäßigen Abständen auf die Abszissenachse aufgetragen sind, und doch ist der Kurve klar zu entnehmen, daß der erste Streifen tatsächlich schmaler ist.

2. Intensität der Lichtabsorption an beiden Streifen. Das Maximum der Absorption ist, wie der Kurve n Fig. 1 zu entnehmen ist, in beiden Streifen nahezu gleich, indem der maximale spezifische Extinktionskoeffizient am ersten Streifen 0,835, am zweiten 0,850 beträgt; der Unterschied von etwa 2% ist durch die unvermeidlichen Fehler in der Feststellung reichlich begründet.

In Heubner und Rosenbergs Aufnahmen ist umgekehrt die maximale Absorption im ersten Streifen größer, und zwar um etwa 1 bis 5%; wenn ich sowohl in ihren als auch in meinen Versuchen die Unterschiede, als von Versuchsfehlern herrührend auslegen darf, glaube ich ihre und meine Befunde so deuten zu sollen, daß die maximale Absorption in beiden Streifen die gleiche ist.

Dem widerspricht nicht die bei vielen Autoren und in allen Lehrbüchern wiederkehrende Angabe, daß dem bloß mit dem Spektroskop bewaffneten Auge der erste Streifen dunkler als der zweite erscheint; denn es ist klar, daß von zwei gleich dunklen Streifen, wenn sie sich von einem gleich hellen Grund abheben, der schmälere dunkler erscheinen wird; um so eher wird dies der Fall sein, wenn der schmälere Streifen mehr im Bereich des heller leuchtenden Gelb, der breitere aber im weniger hellen Grün liegt (Kontrastwirkung).

3. Die Lage der Maxima an den beiden Streifen, sowie des Minimums im helleren Zwischenraum zwischen den Streifen ist am besten aus den einzelnen Versuchsreihen zu ersehen, weniger gut aus der Kurve 2, in der durch Unstimmigkeiten zwischen verschiedenen Versuchsreihen eine Verschiebung der Werte stattfinden konnte (S. 247). Die Lage der Maxima und des Minimums kann annähernd aus den Versuchsreihen ersehen werden, in denen die Ablesungen in größeren Intervallen erfolgten; und ganz genau aus Versuchsreihen, wo an jeder noch einstellbaren Skalastelle abgelesen wurde.

a) Das Maximum im 1. Absorptionsstreifen liegt

Hundeblut 21	zwischen 581,3 ¹⁾ u. 571,9 ¹⁾
„ 20 Lösung 3	„ 581,3 „ 571,9

¹⁾ Mit diesen Ziffern ist jeweils die Mitte des betreffenden Spektralausschnittes bezeichnet.

Hundeblut	20	Lösung 2	zwischen	581,3	u.	571,9
"	22	" 1	"	576,6	"	572,8
Pferdehämoglobin	40	" 3	"	576,6	"	572,8

An Pferdehämoglobin 33 Lösung 5, an Pferdehämoglobin 39 Lösung 2, in denen keine einstellbare Stelle ausfiel, wurde das Maximum bei 575,6 $\mu\mu$ erhalten.

b) Das Minimum zwischen beiden Absorptionsstreifen liegt in den annähernden Versuchsreihen

Hundeblut	21		zwischen	567,2	u.	558,1
"	20	Lösung 3	"	562,6	"	553,6
"	20	" 2	"	562,6	"	553,6
Pferdehämoglobin	33	" 6	"	562,6	"	559,0
"	40	" 3	"	559,9	"	557,2

In den Versuchsreihen mit den lückenlosen Serien

Pferdehämoglobin	39	Lösung 2	bei	559,0	} Mittel 558,1 $\mu\mu$
"	40	" 3	"	559,0 u. 557,2	
"	39	" 7	"	557,2	

Das Minimum liegt demnach bei 558,1 $\mu\mu$.

(An Pferdehämoglobin 39 Lösung 2 wurden zwei weitere Minima bei 555,4 und 554,5 $\mu\mu$ abgelesen, die aber so sehr aus der Reihe springen, daß sie ohne weiteres als Beobachtungsfehler unberücksichtigt bleiben können. Auf einen ähnlichen Fehler dürften auch die beiden Minima von Pferdehämoglobin 40 Lösung 3 lauten. Ähnliche Fehler kommen übrigens auch bei Heubner und Rosenberg vor; so zwei Maxima auf ihrer Platte Id und zwei Minima auf Platte IIa.)

c) Maximum im 2. Absorptionsstreifen.

In den annähernden Versuchen:

Hundeblut	21		zwischen	541,2	u.	533,5
"	20	Lösung 3	"	545,2	"	537,2
"	20	" 2	"	545,2	"	537,2
Pferdehämoglobin	41		"	539,6	"	537,2
Hundeblut	22		"	542,8	"	539,6

In den Versuchsreihen mit den lückenlosen Serien:

Pferdehämoglobin	42		} bei 540,4 $\mu\mu$.
"	33	Lösung 6	

Das Maximum befindet sich daher bei 540,4 $\mu\mu$.

Vergleiche ich diese Werte mit den übrigen, in der Literatur bekannt gewordenen Daten, so ergibt sich folgendes:

	Formanek	Lewin, Miethe, Stenger		Heubner u. Rosenberg	Schumm	Hári
		Kaninchen	Pferd			
Maximum im 1. Streifen	578,1	577,0	579,0	576,9	576,9 ¹⁾ , 578 ²⁾	575,6
Minimum im Zwischenraum	—	—	—	559,7	—	558,1
Maximum im 2. Streifen	541,7	537,0	542,0	540,2	542,4 ¹⁾ , 542 ²⁾	540,4

Man sieht, daß die Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Heubner und Rosenberg am 2. Streifen eine vorzügliche, an beiden anderen Stellen eine hinreichende ist.

4. Graphische Darstellung der Lichtabsorption. An dieser Stelle soll auch einiges über die bisher meist gebräuchliche Art bemerkt sein, wie die Verteilung der Lichtabsorption des Blutfarbstoffes längs des Spektrums dargestellt wird. Von der richtigen und längst bekannten Beobachtung ausgehend, daß bei einfacher spektroskopischer Betrachtung die beiden Streifen bei geringer Blutfarbstoffkonzentration schmaler, bei einer größeren Konzentration breiter erscheinen, an noch mehr konzentrierten Lösungen gar konfluieren, konstruierte Rollett³⁾, meines Wissens als Erster, eine Absorptionskurve, indem er in ein Koordinatensystem die Wellenlängen als Abszissen, die Konzentrationen als Ordinaten auftrug. Nach den mit Recht berühmt gewordenen Photogrammen der Blut-spektra von Rost, Franz und Heise⁴⁾ wurden ebenfalls Kurven⁵⁾ nach demselben Prinzip konstruiert.

Was diese Kurven anbelangt, ist es ja selbstverständlich, daß die genannten Autoren durch dieselben nur demonstrieren wollten, daß bei einfacher spektroskopischer Betrachtung die Streifen je nach der Konzentration bald breiter, bald schmaler

¹⁾ Am Gitterspektrum.

²⁾ Am Prismenspektrum.

³⁾ A. Rollett in Hermanns Handbuch der Physiologie 4, 1, 48, 1880.

⁴⁾ E. Rost, Fr. Franz, R. Heise, Beiträge zur Photographie der Blut-spektra. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 32, 1909.

⁵⁾ z. B. in Oppenheimer, Handbuch der Biochemie 1, 665ff.

erscheinen, wie dies von Formanek¹⁾, dann von Lewin, Miethe und Stenger²⁾, später von Rost, Franz und Heise und anderen ausführlich erörtert wird; jedoch keinesfalls andeuten wollten, daß auch der wirkliche Bereich der Absorption von der Konzentration abhinge. Nun meine ich aber, daß diese sonst so anschaulichen Diagramme geeignet sind, zu Irrtümern Veranlassung zu geben. Der weniger Eingeweihte könnte ihnen leicht etwas entnehmen, was zu behaupten den genannten Autoren durchaus nicht einfiel, nämlich, daß in konzentrierten Lösungen eine Absorption auch an solchen Spektralstellen stattfindet, an denen sie an verdünnten Lösungen fehlt; mit einem Worte, daß der Bereich der Absorption an konzentrierten Lösungen breiter, an verdünnten schmaler wäre.

Darum meine ich, daß, wenn die Lichtabsorption mit einem richtigen Maß gemessen werden und der Grad der Absorption in den verschiedenen Spektralbezirken vergleichend dargestellt werden soll, die von mir gegebenen Kurven der spezifischen Extinktionskoeffizienten den Tatbestand richtiger wiedergeben. Eine solche Kurve ist eindeutig, und wird durch sie u. a. auch die Richtigkeit des Beerschen Gesetzes bewiesen.

(Heubner und Rosenbergs ähnliche Kurven³⁾ lassen sich meinen darum nicht vergleichen, weil der Hämoglobingehalt der Blutlösungen, an denen sie gearbeitet hatten, leider nicht bestimmt wurde.)

IV. Das Absorptionsverhältnis im Zwischenraum zwischen beiden Absorptionsstreifen und am zweiten Absorptionsstreifen. Zur quantitativen Bestimmung des Oxyhämoglobins (resp. auch des reduzierten Hämoglobins, des Kohlenoxydhämoglobins und des Methämoglobins) schlug Hüfner vor, das Absorptionsverhältnis (A) nach Vierordt an zwei engumschriebenen und genau festgestellten Spektralstellen, und zwar im helleren Zwischenraum zwischen beiden Absorptionsstreifen und an der dunkelsten Stelle des Absorptionsstreifens in Grün an Lösungen von bekannter Konzentration (c), aus dieser und den Extinktionskoeffizienten (ϵ),

¹⁾ J. Formanek, Über die Absorptionsspektren des Blutfarbstoffs. Zeitschr. f. analyt. Chem. 40, 1901.

²⁾ l. c.

³⁾ l. c., Tafel II und III.

festzustellen; indem $A = \frac{c}{\epsilon}$. Dieser Wert von A ist dann als Konstante einzusetzen, wenn in einer Hämoglobinlösung die Konzentration aus den Extinktionskoeffizienten berechnet werden soll.

$$c = A \cdot \epsilon.$$

Hüfner wählte in seinen späteren Arbeiten hierfür die Stellen 565—554 resp. 542,5—531,5 $\mu\mu$ und fand für das Absorptionsverhältnis die Werte 0,00207 resp. 0,001312.

In meinen Untersuchungen, die z. T. in einer Nachprüfung der Hüfnerschen Resultate bestanden, kam es sehr wesentlich darauf an, möglichst bei denselben Spektralausschnitten zu untersuchen. Nun habe ich (S. 235) die Schwierigkeiten geschildert, die man bei der Einstellung eines Okularspaltes ohne Meßtrommel hat. Darum mußte ich mich damit begnügen, eine Breite des Okularspaltes gefunden zu haben, die den oben erwähnten Meßbereichen wenigstens sehr nahe steht und diese dann ein- für allemal beibehalten. Diese Meßbereiche waren 565,8—555,9 resp. 541,6—533,1 $\mu\mu$.

Diese Spektralausschnitte sind etwas schmaler, als sie Hüfner genommen hat und speziell in Grüngelb überdies um eine Spur rotwärts verschoben; der Unterschied von 1,9 $\mu\mu$ in der Breite des Wellenlängengebietes an beiden Spektralausschnitten ist nicht von Belang.

Ich erhielt an Lösungen von krystallisiertem Pferde-Oxyhämoglobin, die durch Lösen einer genau gewogenen Menge des Krystallbreies von bekanntem Trockengehalt hergestellt wurden, folgende nach aufsteigender Konzentration der Lösungen geordnete Werte.

Lösung	Konzentration; Volum-Gewichts-%	Absorptionsverhältnis	
		bei 565,8—555,9 $\mu\mu$	bei 541,6—533,1 $\mu\mu$
41	0,102	0,001911	0,001187
34 Lösung 2	0,110	0,001860	0,001155
37 " 3	0,137	0,001823	0,001140
39 " 2	0,152	0,001921	0,001169
38 " 4	0,168	0,001872	0,001176
40 " 3	0,178	0,001920	0,001195
39 " 6	0,202	0,001877	0,001155
		<u>Mittel 0,001884</u>	<u>0,001168</u>

Diese Werte sind um 10 resp. um 13% geringer als die von Hüfner 1894 publizierten (0,00207 und 0,00131). — Butterfield¹⁾ fand bei 564,6—556,1 resp. 542—535,1 $\mu\mu$, also in Spektralbereichen, die den von mir benützten recht nahe stehen, für das Oxyhämoglobin aus Rinder-, Menschen- und Schweineblut folgende, nach ansteigender Konzentration der untersuchten Lösungen geordnete Werte:

bei 564,6—556,1 $\mu\mu$	bei 542—535,1 $\mu\mu$ ²⁾
0,00185	0,001166
190	—
187	1186
191	1222
183	—
185	—
186	—
190	—
187	1208
191	
<hr/> Mittelwert 0,00187	<hr/> 0,001195

Es stellt sich demnach heraus, daß im Zwischenraum zwischen beiden Absorptionstreifen nicht nur der Mittelwert 0,00187 mit dem meinigen, 0,001884, auf etwa 0,5% übereinstimmt, sondern auch daß die maximalen und minimalen Werte beinahe identisch sind; so erhielt

Butterfield 0,00183 bis 0,00191,
ich 0,001823 bis 0,001921.

Es ist dies eine Übereinstimmung, die wahrlich nichts zu wünschen übrig läßt und diese Werte um so eher als die richtigen anzusehen zwingt, weil sie ja an zwei prinzipiell verschiedenen Apparaten erhalten wurden. Auf die weniger gute Übereinstimmung am Streifen in Grün will ich weiter unten (S. 276) noch zurückkommen.

¹⁾ E. E. Butterfield, Über die Lichtextinktion, das Gasbindungsvermögen und den Eisengehalt des menschlichen Blutfarbstoffs im normalen und krankhaften Zustande. Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 1909.

²⁾ Aus Butterfields Tabelle I berechnet.

Tabelle V.

Autor	Im Jahre	Absorptionsverhältnis ¹⁾ im Raum zwischen beiden Absorptionsstreifen (A_I)		Absorptionsverhältnis ¹⁾ am 2. Absorptionsstreifen in Grün (A_{II})		Quotient ²⁾ $\frac{A_I}{A_{II}}$
		Spektral- ausschnitt $\mu\mu$	$A_I \times 10^3$	Spektral- ausschnitt $\mu\mu$	$A_{II} \times 10^3$	
Hüfner	1877	?		?	1,15	
Hüfner	1879	566,8—552,8 ³⁾	1,45	547,2—538,0 ³⁾		1,33
Noorden	1880	566,8—552,8 ³⁾	1,32	547,2—535,4 ³⁾	1,00	1,32
Otto	1882—83	566,8—553,0 ³⁾	1,34	547,2—535,4 ³⁾	1,01	1,33
Otto	1883	566,8—552,8 ³⁾	1,90	547,2—535,4 ³⁾	1,40	1,35
Otto	1885	566,8—552,8 ³⁾	{1,88 ³⁾ {1,44 ⁴⁾	547,2—535,4 ³⁾	{1,40 ³⁾ {1,08 ⁴⁾	{1,34 {1,33
Krüger	1888			552,8—536,0 ³⁾	1,30	
Krüger	1890			552,8—536,0 ³⁾	1,28	
Albrecht	1892	568,7—557,5		546,3—535,1		
Hüfner	1894	565,0—554	2,07	542,5—531,5	1,31	1,58
Kraus, Koß- ler u. Scholz	1899			547,0—538,0		
Dennig	1900	568,7—557,5		546,3—535,1		1,57
Aron u. Müller	1906	569—557	1,88—2,00	546,0—534	1,25—1,46	1,36—1,60
Mohr	1906	?		?		1,23—1,51
Bardachzi	1906	565—554	2,09	542,5—531,5	1,33	
Aron	1907	569—557		546—534		1,37—1,57
Bornstein u. Müller	1907					1,29—1,52
Plesch	1909	569—557		546—539		1,38—1,45
Butterfield	1909	564,6—556,1	1,87	542—535,1		1,58
Masing	1910	568—557		546—539		1,57
Letsche	1910	564,5—556,5	2,08	542—534	1,32	1,58

Da die Werte der Absorptionsverhältnisse Konstanten darstellen sollen, mittels deren man den Gehalt einer Farbstofflösung aus dem spektrophotometrisch bestimmten Extinktionskoeffizienten berechnen kann ($c = \varepsilon \cdot A$), darf ich darüber nicht einfach hinweggehen, daß zwischen Hüfners und meinen Werten ein ziemlicher Unterschied besteht. Die Ursache dieser Divergenz soll in folgendem erörtert werden.

Aus Tabelle V, in der die Daten der mir zugänglichen einschlägigen Literatur zusammengestellt sind, läßt sich ohne weiteres feststellen, daß ähnliche und stärkere Differenzen auch in den Befunden anderer Autoren vorkommen.

¹⁾ In der Regel sind hier nur Mittelwerte angeführt; nur wenn die Einzelwerte besonders auseinandergelassen sind, sind Maxima und Minima angegeben.

²⁾ Angaben der alten Ausdrucksweise nach S. 234 umgerechnet.

³⁾ Mit dem Hüfnerschen Apparat.

⁴⁾ Mit dem Vierordtschen Apparat.

$$\text{5) } \frac{A_I}{A_{II}} = \frac{\varepsilon_{II}}{\varepsilon_I}$$

Fragen wir danach, wodurch diese Differenzen verursacht sein können, so kommen folgende Möglichkeiten in Betracht:

1. Konstruktionsfehler der benutzten Apparate.
2. Fehler in deren Justierung und Kalibrierung.
3. Verschiedenheit der Spektralausschnitte, bei denen verschiedene Autoren beobachtet hatten.
4. Sonstige Versuchsfehler im Gebrauche der Apparate.
5. Verschiedene Beschaffenheit der untersuchten Blut- resp. Hämoglobinlösungen.
6. Systematische Unterschiede infolge der Verwendung prinzipiell verschieden konstruierter Spektrophotometer.

1. Konstruktionsfehler. Von Hüfners¹⁾ allererster Arbeit, die noch am Vierordtschen Spektrophotometer ohne eine genaue Angabe des gewählten Spektralbereiches ausgeführt wurde, abgesehen, waren es die Arbeiten von Hüfner²⁾, Noorden³⁾ und von Otto⁴⁾, in denen die Absorptionsverhältnisse an zwei genau bezeichneten Stellen des Spektrums mit Hilfe des Hüfnerschen Spektrophotometers bestimmt wurden. Die Resultate stimmten so ziemlich überein.

Bald darauf erhielt jedoch Otto⁵⁾ an einem verbesserten Hüfnerschen Apparat wesentlich höhere Werte, desgleichen auch in einer weiteren Arbeit⁶⁾; was aber besonders auffallend ist, erhielt er in der letztgenannten Arbeit, an denselben Lösungen, mit einem Vierordtschen Apparate wieder wesentlich geringere, den allerersten ähnliche Werte. Bei solchem Stande der Dinge wird man wohl nicht fehlgehen, wenn man Konstruktionsfehler zum mindesten an zweien, wahrscheinlich aber an allen dreien der genannten Apparate annimmt; um so eher, als in den genannten Publikationen (wie auch in den von Marshall⁷⁾ über Kohlenoxyd-Hämoglobin) eine deutliche Abhängigkeit des Absorptionsverhältnisses von der Konzentration der untersuchten Hämoglobinlösung wahrzunehmen ist, was ja an sich schon von vornherein unrichtig ist.

¹⁾ G. Hüfner, Über die Quantität Sauerstoff, die 1 g Hämoglobin zu binden vermag. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1, 321, 1877.

²⁾ G. Hüfner, Über die Bestimmung des Hämoglobin- und Sauerstoffgehaltes im Blut. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 3, 4, 1879.

³⁾ Carl von Noorden, Beiträge zur quantitativen Spektralanalyse, insbesondere zu derjenigen des Blutes. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 4, 19 ff., 1880.

⁴⁾ J. Otto, Über das Oxyhämoglobin des Schweines. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 7, 62, 1882 × 1883.

⁵⁾ Jac. G. Otto, Beiträge zur Kenntnis der Blutfarbstoffe. *Arch. f. d. ges. Physiol.* 31, 244, 1883.

⁶⁾ Jac. G. Otto, Untersuchungen über die Blutkörperchenzahl und den Hämoglobingehalt des Blutes. *Arch. f. d. ges. Physiol.* 36, 18, 1885.

⁷⁾ John Marshall, Bestimmung des Molekulargewichts von Hundehämoglobin durch Verdrängung des Kohlenoxyds seiner Kohlenoxydverbindung mittels Stickoxyd. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 7, 88 ff., 1883.

Wie weit da die Verwirrung gehen kann, geht aus folgender Stelle in dem Referat über eine Arbeit Torups¹⁾ hervor: „Das Absorptionsverhältnis ist auch keine konstante Größe, sondern ist von der Konzentration der Lösung abhängig . . . für Oxyhämoglobinlösungen gefunden, daß von einem Gehalt der Lösung von 0,0008% an das Absorptionsverhältnis mit steigender wie mit abnehmender Konzentration zunimmt.“

Kleinere Mängel dürfte auch der von Hüfner im Jahre 1894 verwendete Apparat gehabt haben, da Butterfield²⁾ 1909 direkt darauf hinweist, daß das 15 Jahre später von ihm benutzte Exemplar des Hüfnerschen Apparates besser ausgeführt war.

2. Justierungs- und Kalibrierungsfehler. Diesbezüglich kann ich mich nur dem anschließen, was Butterfield³⁾ sagt: „Spektrophotometrische Werte ohne Angabe über die Konstruktion des Apparates, die Eichung des Prismas in Wellenlängen, über etwaige Kompensationsvorrichtungen und über die Breite des Eintrittspaltes und der Okularblende sind, insofern sie mit andern spektrophotometrischen Werten verglichen werden sollten, vollkommen wertlos.“

Was insbesondere die Kalibrierung anbelangt, sei bemerkt, daß diese sogar bei Hüfner einiges zu wünschen übrig läßt; sagt er doch in einer anderen Arbeit⁴⁾:

„Da zunächst nur die Hauptpunkte der Kurve durch Markierung der wichtigeren Fraunhoferschen Linien auf der Abszisse festgestellt werden können, so ergibt die Verbindung der Endpunkte der auf *D* und *E* errichteten Ordinaten in der Regel eine zu lange gerade Linie. Um diese für uns gerade besonders wichtige Strecke der wirklichen Form der Kurve soweit wie möglich anzunähern, müssen noch eine Anzahl dazwischen liegender Ordinaten mittels einer bekannten Interpolationsformel berechnet und ihre Endpunkte durch kurze gerade Linien verbunden werden.“

Es muß also hervorgehoben werden, daß durch Hüfner zwischen den Linien *D* und *E* kein weiterer Punkt direkt bestimmt wurde, was immerhin als ein Mangel empfunden werden kann.

Auch Bardachzi⁵⁾ hat sich zur Eichung seines Apparates bloß

¹⁾ Sophus Torup, Über die Kohlensäurebindung des Blutes mit besonderer Rücksicht auf die Verbindung des Hämoglobins mit Kohlensäure (dänisch, Kopenhagen 1877). Referat im Jahresbericht für Tierchemie, R. Maly 17, 115.

²⁾ l. c. S. 193.

³⁾ l. c. S. 204; im Original gesperrt.

⁴⁾ G. Hüfner, Versuche über die Dissoziation der Kohlenoxydverbindung des Blutfarbstoffs; nebst einigen Bemerkungen über Ursache und Dauer der Giftwirkung der Alkaloide. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1895, 217, Anmerkung.

⁵⁾ Franz Bardachzi, Über den Blutfarbstoff der *Thalassochelys corticata*. Zeitschr. f. physiol. Chem. 49, 470, 1906. Berufung auf: Stu-

des Sonnenspektrums bedient; demzufolge konnte seine Kurve gerade an der wichtigsten Stelle zwischen *D* und *E*, wo keine Fraunhofersche Hauptlinie dazwischenfällt, Ungenauigkeit aufweisen.

Was Aron und Müller¹⁾ anbelangt, hatte schon Zeynek²⁾ der Vermutung Ausdruck gegeben, daß es sich in der Arbeit der genannten Autoren um einen Kalibrierungsfehler handeln könnte. Wenn Aron und Müller³⁾ darauf erwidern, daß „eine erneute Prüfung der Spektrallinien *D* und *b* genau die gleiche Lage“ . . . hatte wie die früheren Bestimmungen, folgt hieraus nicht, daß auch die dazwischen liegende Strecke — und diese ist die wichtigste — genau festgestellt sei. Die Kalibrierung, wie sie von Butterfield ausgeführt wurde, ist genauer als die von Hüfner, indem auch die Stelle der zwischen den Linien *D* und *E* gelegenen Spektrallinie des Thalliums festgestellt wurde. (An meinem Apparat wurde überdies nach der Lage der in Grün gelegenen Spektrallinie des Quecksilbers markiert.)

3. Spektralausschnitt. Daten, die sich auf Lichtabsorption beziehen, jedoch nicht möglichst genau im selben Spektralausschnitt erhalten wurden, sind, wie dies schon Butterfield bemerkt, nicht zu vergleichen. Hier kommt eigentlich das zur Geltung, was im Vorangehenden über die Kalibrierung gesagt wurde; ist nämlich diese ungenau, so hat man ja gar keine Gewähr dafür, daß die Ablesungen auch tatsächlich im angegebenen Spektralbereich erfolgt sind.

Hiervon abgesehen, fällt es in Tabelle V sofort auf, daß die Autoren sogar nach den eigenen Angaben nicht immer in den von Hüfner angegebenen Spektralbezirken beobachtet hatten.

Auf die ältesten Daten von Hüfner, Noorden und Otto, die, wie oben auseinandergesetzt wurde, offenbar an fehlerhaft konstruierten Apparaten erhalten wurden, will ich nicht näher eingehen, obzwar die Divergenz jener Daten teilweise auch davon herrühren mag, daß hier noch andere Spektralbezirke figurierten, wie von Hüfner im Jahre 1899 angegeben wurde. Etwas näher will ich jedoch auf Arons und Müllers Ergebnisse reflektieren, da sie ja auf Grund ihrer Befunde der ganzen Hüfnerschen Lehre von der Konstanz der optischen Eigenschaften und der Einheitlichkeit des Hämoglobins wiederholt entgegengetreten sind⁴⁾ und Müller erst im Jahre 1913⁵⁾ die eigenen, von den Hüfner-

dien über die dem Tryptophan zugeschriebenen Eiweißreaktionen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 148. 1906.

¹⁾ Hans Aron und Franz Müller, Über die Lichtabsorption des Blutfarbstoffs. Untersuchungen mit dem Hüfnerschen Spektrophotometer. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1906, Suppl. S. 121 ff.

²⁾ Bemerkung im Anschluß an Bardachzisz zitierte Arbeit S. 469.

³⁾ Hans Aron und Franz Müller, Über die Lichtresorption des Blutfarbstoffs. Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 443, 1906, 1907.

⁴⁾ I. c. u. Franz Müller in Oppenheimers Handb. d. Biochem. 1, 675.

⁵⁾ F. Müller in Oppenheimers Handb. d. Biochem. Ergänzungsband S. 117.

sehen abweichenden Befunde methodischen Abweichungen zugeschrieben hat.

Aron und Müller, dann Aron¹⁾ selbst, später Plesch²⁾ haben Spektralbezirke gewählt, die, soweit mir bekannt, in keiner der Hufnerschen Publikationen vorkommen, sondern im Jahre 1892 von Hufnerschen Mechaniker Albrecht³⁾ in seiner Anleitung zum Gebrauch des Hufnerschen Spektrophotometers angegeben wurde. (Die Angabe Müllers⁴⁾, daß er die Wellenlängen 532,1—542,4 und 554,4—564,7 $\mu\mu$, also die Hufnerschen, benutzt hatte, beruht auf einem Irrtum, da ja in den betreffenden Arbeiten ausdrücklich die Wellenlängen 534—546 und 557—569 angegeben sind.)

Aron und Müller, dann Aron, später Plesch fanden die Werte für das Absorptionsverhältnis so schwankend, daß von einer Konstante kaum mehr gesprochen werden kann, was restlos erklärt werden kann, wenn man einen Blick auf Fig. 3 wirft.

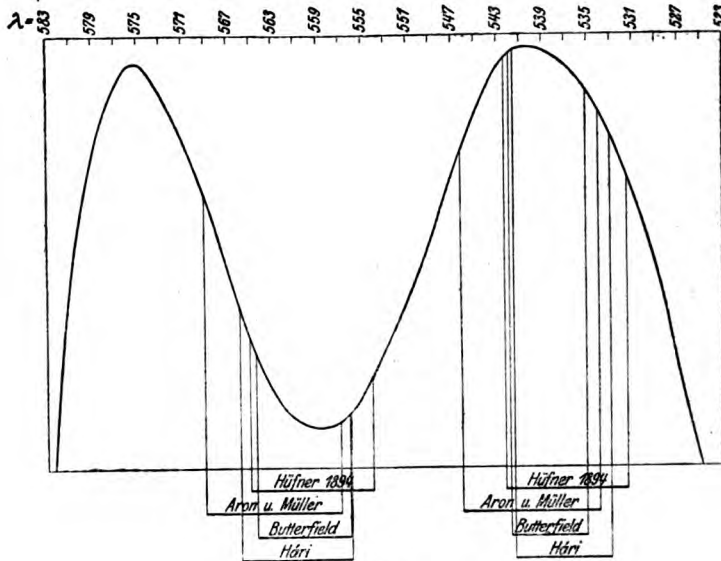


Fig. 3.

Sind nämlich schon die von Hufner, Bardachzi, Butterfield und weiter auch von mir gewählten Spektralausschnitte nicht ganz sym-

¹⁾ Hans Aron, Über die Lichtabsorption und den Eisengehalt des Blutfarbstoffs. Diese Zeitschr. 3, 3 ff., 1907.

²⁾ Johann Plesch, Hämodynamische Studien. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 6, 413 ff., 1909.

³⁾ Eugen Albrecht, Anleitung zum Gebrauche des Hufnerschen Spektrophotometers 1892.

⁴⁾ F. Müller, *ibid.* S. 116.

metrisch um das Minimum (im Zwischenraum zwischen beiden Absorptionstreifen), resp. um das Maximum (in Grün) gelagert, so sind vollends die von Aron und Müller, Plesch usw. benutzten Spektralausschnitte nicht nur stark rotwärts verschoben, sondern auch so gelagert, daß gleichzeitig mit dem Minimum im Zwischenraum ein ansehnlicher Streifen des rotwärts benachbarten dunklen Gebietes mit im Gesichtsfeld erscheint; und gleichzeitig mit dem Maximum in Grün ein ansehnlicher Streifen des rotwärts benachbarten helleren Gebietes. Nun ist aber die Einstellung des Okularrohres auf einen gewissen Spektralbezirk an jedem Apparat eine heikle Sache und mit unvermeidlichen — wenn auch an guten Apparaten mit geringen — Fehlern behaftet; diese Einstellungsfehler müssen aber einen um so größeren Effekt zur Folge haben, je rascher sich die Lichtabsorption im betreffenden Gebiet ändert, mit anderen Worten, je steiler dort die Absorptionskurve verläuft. Meines Erachtens ist das die Ursache, warum die genannten Autoren Werte erhielten, die von den Hüfnersohen verschieden sind und außerdem auch so starke Schwankungen zeigen.

Es ist dies der Ort, um auf Fehler hinzuweisen, die auch sonst in der Einstellung des Okularspaltes begangen werden. So wurde in Krügers¹⁾ Arbeiten der Spektralausschnitt 552,8—536 $\mu\mu$ gewählt, der ja durchaus verschieden ist von allen, die andere Autoren benutzten.

Kraus, Koßler und Scholz²⁾, die im Jahre 1899 an einem Glangschen Apparat arbeiteten, beobachteten bei 547—538 $\mu\mu$, also in einem Spektralbereich, den Hüfner im Jahre 1879 verwendete, aber bereits im Jahre 1894 aufgegeben hatte; zu der Berechnung ihrer Ergebnisse bedienten sie sich jedoch des Absorptionsverhältnisses, das Hüfner in seiner allerersten Arbeit 1877 angegeben hatte.

4. An sonstigen Möglichkeiten zu Versuchsfehlern fehlt es im Gebrauch der recht komplizierten Apparate und in der Versuchseinrichtung wahrhaftig nicht, so die Beschaffenheit und Aufstellung der Lichtquelle, der Erhaltung einer gleichmäßigen Temperatur der lichtbrechenden Medien des Apparates und der Lösung (S. 240), die richtige Breite des Eintrittspaltes [Butterfield³⁾] usw.

5. Beschaffenheit der untersuchten Lösung. Auf diesen Punkt soll im nächsten Abschnitt (S. 276, 277) eingegangen werden.

6. Verschiedenheit der Apparate. Es ist von verschiedenen Autoren mehr oder minder stark betont worden, daß die für das Absorptionsverhältnis erhaltenen Werte auch von der Art des verwendeten

¹⁾ Friedrich Krüger, Beobachtungen über die Absorption des Lichtes durch das Oxyhämoglobin. Zeitschr. f. Biolog. 24, 48, 1888 und: Beiträge zur Kenntnis des arteriellen und venösen Blutes verschiedener Gefäßbezirke, *ibid.* 26, 467, 1890.

²⁾ Fr. Kraus, Koßler und W. Scholz, Über die Sauerstoffkapazität des menschlichen Blutes in Krankheiten. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 42, 331, 1899.

³⁾ *l. c.* S. 200.

Spektrophotometers abhängen. So behauptet Gallerani¹⁾ direkt, daß das Absorptionsverhältnis für jeden Apparat eigens bestimmt werden muß; sogar Butterfield sagt²⁾, daß . . . „A nicht notwendig den gleichen Wert bei jedem Apparat zu haben braucht“. Würde sich das bewahrheiten, so würde die Spektrophotometrie prinzipiell und auch methodisch recht wenig Vertrauen verdienen. Kehre ich nun zu der (S. 255) betonten Tatsache zurück, daß Hüfners letzte Werte um etwa 10% niedriger als meine sind, so ließe sich dies teils daraus erklären, daß der von Hüfner benutzte Apparat noch nicht den Grad der Vollkommenheit hatte als der später von Butterfield verwendete; teils auch durch die kleinen Fehler, die ich unter 2. bemängelt habe.

Es bliebe noch der recht merkwürdige Umstand zu erklären, daß Letsches³⁾ und Butterfields am selben Apparate erhaltenen Werte soweit differieren, wo doch Letsche nach seinen Worten genau unter denselben Verhältnissen gearbeitet hatte. Mangels an diesbezüglichen Einzelangaben läßt sich hierüber nichts weiter sagen. Doch möchte ich weder Letsche beipflichten, wenn er die Möglichkeit annimmt, daß hier „sinnesphysiologische Qualitäten“ der Beobachter im Spiele sein können, noch auch Heubner und Rosenberg⁴⁾, die auch etwas Ähnliches andeuten. Denn wenn ich auch zugeben kann, daß subjektive Momente einen gewissen Einfluß auf die Ablesungen ausüben, die dann Unstimmigkeiten im Endresultat verschiedener Versuche bzw. Versuchsreihen zur Folge haben, — halte ich es für ausgeschlossen, daß auf diese Weise systematische Fehler entstehen könnten. Ich halte es vielmehr für wahrscheinlich, daß es sich bei allen ähnlichen Divergenzen um Fehler in der Einrichtung und Durchführung der Versuche handelt. Denn an solchen Momenten, die vernachlässigt, einem übel mitspielen können, fehlt es, wie wir oben gesehen haben, wahrhaftig nicht.

Was Butterfields Publikation anbelangt, glaube ich nicht fehlzugehen, wenn ich seine Angaben zu den allergeauesten und seine Arbeitsweise als die verläßlichste und umsichtigste bezeichne. Man braucht nur die Kautelen zu beachten, die er bei der Kalibrierung seines Apparates vor Augen hielt, ferner seine Ausführungen über den Rauchglas-teil des Hüfnerschen Apparates, über die Weite des Okular- und Eintrittspaltes, um Vertrauen zu seinen Ergebnissen zu fassen.

Wenn auch nun der Wert von 0,00188 als Mittelwert für das Absorptionsverhältnis im Zwischenraum sichergestellt ist, läßt sich nicht verkennen, daß der maximale Unterschied zwi-

¹⁾ G. Gallerani, Sur la nature et les variantes du rapport d'absorption spectrophotométrique de l'oxyhémoglobine etc. Arch. ital. de biologie 37, 20, 1902.

²⁾ l. c. S. 192.

³⁾ E. Letsche, Beiträge zur Kenntnis des Blutfarbstoffes. Zeitschr. f. physiol. Chem. 76, 1911.

⁴⁾ l. c. S. 346.

schen den experimentell festgestellten Einzelwerten immerhin gegen 4% beträgt. Soll daher der Hämoglobingehalt einer Lösung auf spektrophotometrischem Wege aus den abgegebenen Extinktionskoeffizienten und dem Absorptionsverhältnis festgestellt werden, wird man auf ähnliche Fehler gefaßt sein müssen.

Was ältere Apparate nicht leisten können, ist jedoch von neueren zu erhoffen, und da ist in erster Linie an das von Martens¹⁾, später von Martens und Grünbaum²⁾ verbesserte Modell des Königschen Spektrophotometers zu denken, das meines Wissens bisher bloß von Butterfield³⁾ zu Untersuchungen an Hämoglobinlösungen verwendet wurde. Durch die eigentümliche Konstruktion dieses Apparates fällt hier eine Reihe von Fehlerquellen weg, die an allen älteren Apparaten mehr oder minder störend wirken.

V. Quotient der Absorptionsverhältnisse (resp. der Extinktionskoeffizienten) an den beiden von Hüfner vorgeschlagenen Spektralstellen. Ist das Absorptionsverhältnis an einer Stelle des Spektrums konstant und hat es auch für jede andere Stelle wieder einen anderen, jedoch konstanten Wert, so ist der Quotient der Absorptionsverhältnisse, die man an zwei verschiedenen Stellen des Spektrums erhält, ebenfalls konstant und für den betreffenden Farbstoff charakteristisch. Hat man es jedoch mit einer Lösung zu tun, die zwei oder mehrere Farbstoffe enthält, so muß auch der Quotient der Absorptionsverhältnisse einen Wert haben, der verschieden ist von dem, der für die Lösung eines Farbstoffes festgestellt ist. Diesen Umstand benützte Hüfner, um das Oxyhämoglobin von den übrigen Hämoglobinverbindungen qualitativ zu unterscheiden, resp. um festzustellen, ob die von ihm zu seinen Sauerstoffverbindungsversuchen verwendeten Hämoglobinlösungen auch wirklich rein, also frei von anderen verwandten Farbstoffen wären.

¹⁾ F. F. Martens, Über eine Neukonstruktion des Königschen Spektrophotometers. Verhdl. d. Deutsch. physikal. Ges. 1, 1899.

²⁾ F. F. Martens und F. Grünbaum, Über eine Neukonstruktion des Königschen Spektrophotometers. Annal. d. Physik, 4. Folge, 12, 1903.

³⁾ E. E. Butterfield, Zur Photometrie des Blutfarbstoffs. Zeitschr. f. physiol. Chem. 79, 1912.

Hüfners neuere (ab 1894) Werte für das Absorptionsverhältnis bei 565—554 $\mu\mu$ (I) resp. 542,5—531,5 $\mu\mu$ (II) sind 2,07 resp. 1,31, daher beträgt der Quotient $I : II = 1,578$.

Denselben Wert erhielt Hüfner auch als Mittelwert einer ganzen großen Reihe von Versuchen, in denen er bloß die Extinktionskoeffizienten an den genannten Spektralstellen bestimmt hatte, ohne aus diesen und der Konzentration der Lösung die Absorptionsverhältnisse zu berechnen. Das kommt jedoch auf dasselbe hinaus, denn bei einer Konzentration c ist

$$\text{an Stelle I gemessen } c = \varepsilon_I A_I,$$

$$\text{„ „ II „ „ } c = \varepsilon_{II} A_{II},$$

woraus $\varepsilon_I A_I = \varepsilon_{II} A_{II}$, und hieraus

$$\frac{A_I}{A_{II}} = \frac{\varepsilon_{II}}{\varepsilon_I}.$$

Also erhält man einen mit dem obigen Quotienten identischen Wert, wenn man die Quotienten der Extinktionskoeffizienten nimmt, jedoch nicht wie bei den Absorptionsverhältnissen, $I : II$, sondern umgekehrt $II : I$.

Aus den Werten, die ich in meinen Versuchen für die Absorptionsverhältnisse erhielt (S. 254), ergibt sich nun ein höherer Quotient als der von Hüfner berechnete; dieser höhere Wert beträgt $1,884 : 1,168 = 1,613$.

Der Unterschied ist nicht groß, bedarf jedoch wieder einer näheren Erklärung, um so mehr, da auch in den Befunden anderer Autoren eine weitgehende Divergenz zu finden ist.

In den in Tabelle V zusammengestellten Arbeiten erhielten Hüfner (1879), Noorden (1880) und Otto (1882—1885) Werte, die in engen Grenzen um 1,34 herum schwankten; daß diese Werte so auffallend niedrig waren, ist teils den S. 261 u. 262 vermuteten Konstruktionsfehlern der Apparate zuzuschreiben, teils jedoch dem Umstande, daß hier noch in Spektralausschnitten gearbeitet wurde, die wesentlich breiter als die später von Hüfner vorgeschlagenen waren. Außerdem war der Spektralausschnitt in Grün stark rotwärts verschoben. — Beides muß zur Folge haben, daß, wie dies bereits von Butterfield¹⁾ auseinandergesetzt war, dem Minimum im Zwischenraum ein dunklerer Streifen, dem Maximum im zweiten Streifen ein hellerer Streifen sich zugesellt, daher der Quotient aus doppeltem Grund kleiner ausfallen muß.

Daß Aron und Müller, Mohr²⁾, später Aron allein, Born-

¹⁾ l. c. S. 198.

²⁾ L. Mohr, Über regulierende und kompensierende Vorgänge im Stoffwechsel der Anämischen. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 2, 1906.

stein und Müller¹⁾, Plesch ebenfalls geringere Werte erhielten, läßt sich wieder zwanglos daraus erklären, daß sie bei anderen Spektralausschnitten gearbeitet haben, als Hüfner 1894 angegeben hatte; daß aber ihre Quotienten so stark schwankten, ist die unmittelbare Folge der Unsicherheit in der Bestimmung der Lichtabsorption, die ich auseinandergesetzt habe. Wieso Dennig²⁾ und später Masing³⁾, die ebenfalls von Aron und Müller und den übrigen oben genannten Autoren verwendeten Spektralausschnitte benutzt haben, dieselben Quotienten erhalten konnten, wie Hüfner in wesentlich anderen Spektralbezirken, ist mir allerdings nicht recht verständlich.

In welchem hohem Grade der Wert des Quotienten von der richtigen Wahl der Spektralausschnitte abhängt, habe ich in einer Reihe von Versuchen erfahren müssen, die den auf S. 254 beschriebenen und weiter unten noch zu beschreibenden zeitlich vorangingen.

Diese Versuche wurden unter denselben Bedingungen wie die späteren ausgeführt, doch stellte es sich erst nachträglich heraus, daß der Apparat bei diesen Versuchen noch nicht mit der Genauigkeit kalibriert war wie in den späteren. Der Kalibrierungsfehler hatte zur Folge, daß jeweils für eine gewünschte Wellenlänge eine Stelle der Orientierungsskala eingestellt wurde, die einer geringeren Wellenlänge — als die gewünschte — entsprach.

In nachstehender Tabelle VI habe ich die Extinktionskoeffizienten und deren Quotienten aus diesen Versuchsreihen zusammengestellt.

Wie aus Tabelle VI ersichtlich, sind die Quotienten in diesen Versuchen mit wenig Ausnahmen weit niedriger, als sich später mittels des tadellos kalibrierten Apparates ergab, ja sogar niedriger als die von Hüfner erhaltenen Werte.

Natürlich sind diese Werte an sich nicht unrichtig; nur sind sie eben an anderen Spektralstellen erhoben als die Hüfnerschen, daher zu einem Vergleich mit dem Hüfnerschen nicht geeignet.

Der Quotient, den Butterfield als Endergebnis von 88 Bestimmungen an verschiedenen Blut- resp. Hämoglobinlösungen erhielt, beträgt 1,58, ist also mit dem Hüfnerschen beinahe identisch; auch Letsche erhielt in zirka 100 Bestimmungen den Quotienten 1,58. Diese Werte weichen von dem von mir gefundenen immerhin wesentlich ab. Der Unterschied ist noch

¹⁾ Arthur Bornstein und Franz Müller, Untersuchungen über den genuinen Farbstoff normaler und mit chlorsauren Salzen vergifteter Katzen. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1907.

²⁾ Ad. Dennig, Über die Einwirkung einiger vielgebrauchter Arzneimittel auf die Methämoglobinbildung im Blute. Arch. f. klin. Med. 65, 1900.

³⁾ Ernst Masing, Über das Hämoglobin in normalen und pathologischen Zuständen. 1. Teil. Arch. f. klin. Med. 98, 1910.

Tabelle VI.

Untersuchte Lösung	Extinktions- koeffizienten und deren Quotient	Die Untersuchung hat statt- gefunden	
		in den Spektral- bezirken $\mu\mu$	Wann?
Pferdeblut 2, Lösung 1	$\frac{1,025}{0,656} = 1,563$	561,2—550,6 536,8—528,8	sofort
" 2, " 1	$\frac{1,016}{0,663} = 1,532$	561,2—550,6 636,8—528,8	innerhalb 24 Stunden
" 3, " 1	$\frac{0,854}{0,558} = 1,532$	561,2—550,6 536,8—528,8	sofort
Pferdehämoglobin 4, Lösung 0	$\frac{0,739}{0,489} = 1,510$	561,2—550,6 536,8—528,8	"
Pferdehämoglobin 4, Lösung 1	$\frac{0,631}{0,410} = 1,540$	561,2—550,6 536,8—528,8	"
Pferdehämoglobin 4, Lösung 2	$\frac{1,098}{0,680} = 1,541$	561,2—550,6 536,8—528,8	"
Schweineblut 5	$\frac{0,692}{0,428} = 1,618$	561,2—550,6 536,8—528,8	innerhalb 24 Stunden
Pferdeblut 7	$\frac{0,611}{0,411} = 1,487$	563,9—554,0 539,2—530,8	sofort
Pferdehämoglobin 8, Lösung 1	$\frac{0,262}{0,173} = 1,511$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
Pferdehämoglobin 8, Lösung 2	$\frac{0,364}{0,259} = 1,405$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
Pferdehämoglobin 8, Lösung 3	$\frac{0,895}{0,022} = 1,438$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
Pferdehämoglobin 8, Lösung 5	$\frac{0,742}{0,490} = 1,514$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
Hundeblut 9	$\frac{0,762}{0,510} = 1,478$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
Pferdeblut 10	$\frac{1,212}{0,793} = 1,528$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
Hundehämoglobin 11	$\frac{0,515}{0,350} = 1,470$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
Hundeblut 12, Lösung 1	$\frac{0,705}{0,462} = 1,525$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
" 12, " 2	$\frac{1,014}{0,652} = 1,555$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
Hundehämoglobin 12, Lösung 1	$\frac{0,910}{0,596} = 1,527$	563,9—554,0 539,2—530,8	"

Tabelle VI (Fortsetzung).

Untersuchte Lösung	Extinktions- koeffizienten und deren Quotient	Die Untersuchung hat statt- gefunden	
		in den Spektral- bezirken $\mu\mu$	Wann?
Hundehämoglobin 12, Lösung 2	$\frac{0,734}{0,462} = 1,587$	563,9—554,0 539,2—530,8	sofort
Hundehämoglob. 12, B	$\frac{0,463}{0,605} = 1,508$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
Hundeblut 13	$\frac{0,934}{0,593} = 1,575$	563,9—554,0 539,2—530,8	"
Hundeblut 14	$\frac{0,920}{0,608} = 1,513$	563,9—554,0 539,2—530,8	"

größer, wenn ich den Quotienten aus den 4 Versuchen Butterfields nehme, in denen ich aus seinen Daten auch das Absorptionsverhältnis in Grün berechnen konnte (S. 254); er beträgt im Mittelwert $\frac{1,875}{1,195} = 1,567$.

Wodurch ist diese Divergenz begründet? Da der Wert für das Absorptionsverhältnis im Zwischenraum zwischen beiden Streifen von Butterfield und von mir beinahe gleich groß gefunden wurde (S. 255), kann der Unterschied im Werte der Quotienten nur dadurch verursacht sein, daß für die Lichtabsorption am zweiten Streifen Butterfield und ich verschiedene Werte erhielten, eine Tatsache, die schon gestreift war.

Zunächst fällt es auf, daß auch Butterfield zuweilen weit höhere Werte erhalten hat; so an 44 Rinderblutproben 11 mal 1,59, 2 mal 1,60, 1 mal 1,62; an 30 Proben von Menschenblut 6 mal 1,59, 4 mal 1,60; endlich hatte er je 1 mal Hühner- und Rattenblut untersucht und 1,61 resp. 1,63 erhalten. Dabei war jedoch der Quotient von den 74 Untersuchungen (44 Rinder-, 30 Menschenblutproben) 8 mal bloß 1,56 und 3 mal gar 1,55. Auch bei anderen Autoren, die im Durchschnitt einer großen Anzahl von Versuchen 1,58 erhielten, kamen ab und zu dieselben hohen Werte vor. So findet man in Masings¹⁾

¹⁾ l. c.

Tabelle VII.
Extinktionskoeffizienten und deren Quotienten, festgestellt zu verschiedenen Zeiten nach der Bereitung der soda-alkalischen Lösung in den Spektralbezirken 565,8 bis 555,9 und 541,6 bis 533,1 $\mu\mu$.

Untersuchte Lösung	Die Untersuchung hat stattgefunden:				Bemerkungen
	Sofort	Innerhalb 24 Stunden	Zwischen der 24. u. 48. Std.	Zwischen der 48. u. 96. Std.	
Hundeblut 16	$\frac{0,900}{0,552} = 1,628$			Nach der 96. Stunde	Stammlösung neutral ¹⁾ .
" 17	$\frac{0,820}{0,511} = 1,604$				"
" 18	$\frac{0,733}{0,460} = 1,593$				Stammlösung neutr.; v. d. Verdünnung 8 Std. im Zimmer gestanden.
Hundeblut 19, Lösung 1	$\frac{0,716}{0,447} = 1,600$	$\frac{0,689}{0,444} = 1,552$			Stammlösung neutral.
Hundeblut 19, Lösung 1	$\frac{0,689}{0,444} = 1,550$				"
Hundeblut 19, Lösung 2	$\frac{0,919}{0,584} = 1,575$				"
Hundeblut 19, Lösung 3a	$\frac{0,950}{0,603} = 1,574$				Neutr. Stammlös. v. d. Verdünnung über Nacht im Eisschrank gest.
Hundeblut 19, Lösung 3b	$\frac{0,463}{0,294} = 1,572$				Weitere Verdünnung der vorangehenden alkalischen Lösung.
Hundeblut 19, Lösung 1	$\frac{0,879}{0,559} = 1,574$				Stammlösung neutral.*
Hundeblut 19, Lösung 2	$\frac{0,892}{0,566} = 1,575$	$\frac{0,881}{0,556} = 1,582$			Neutr. Stammlös. v. d. Verdünnung über Nacht im Eisschrank gest.

¹⁾ „Neutral“ bedeutet hier wie auch weiter unten: in destilliertem Wasser gelöst.

Hundeblut 20, Lösung 1	$\frac{0,735}{0,457} = 1,610$		Stammlösung neutral.
Hundeblut 20, Lösung 2	$\frac{0,736}{0,456} = 1,615$		Neutr. Stammlösg. v. d. Verdünnung über Nacht im Eisschrank gest.
Hundehämo- globin 20		$\frac{0,904}{0,571} = 1,582$	Stammlösung neutral.
Hundeblut 21	$\frac{1,096}{0,688} = 1,604$		Neutr. Stammlösg. v. d. Verdünnung 8 Std. im Eisschrank gest.
Hundeblut 22, Lösung 1	$\frac{1,527}{0,936} = 1,631$		Neutr. Stammlösg. v. d. Verdünnung 18 Std. im Eisschrank gest.
Hundeblut 22, Lösung 2		$\frac{0,709}{0,456} = 1,554$	Weitere Verdünnung der vorangehenden Lösung 1, die über Nacht im Eisschrank gestanden.
Hundehämo- globin 22	$\frac{0,980}{0,620} = 1,580$		Soda-alkalische Stammlösung über Nacht im Eisschrank gestanden.
Hundeblut 23, Lösung 1	$\frac{1,468}{0,893} = 1,643$		Stammlösung neutral.
Hundeblut 23, Lösung 1 b		$\frac{0,697}{0,445} = 1,565$	Weitere Verdünnung der vorangehenden Lösung 1
Pferdehämo- globin 24	$\frac{0,674}{0,414} = 1,626$		Stammlösung soda-alkalisch.
Hundehämo- globin 25	$\frac{0,755}{0,470} = 1,607$	$\frac{0,720}{0,468} = 1,539$	" "
Hundeblut 26	$\frac{0,697}{0,422} = 1,652$	$\frac{0,671}{0,432} = 1,566$ $\frac{0,662}{0,426} = 1,556$	Stammlösung neutral.
"		$\frac{0,637}{0,403} = 1,583$ $\frac{0,620}{0,397} = 1,563$	
"			

Tabelle VII (Fortsetzung).

Untersuchte Lösung	Die Untersuchung hat stattgefunden:				Bemerkungen
	Sofort	Innerhalb 24 Stunden	Zwischen der 24. u. 28. Std.	Zwischen der 48. u. 96. Std.	
Hundeblut 28	0,740 0,465	1,592 0,434	0,702 0,452	1,580 1,580	Stammlösung neutral.
Hundehämo- globin 28		0,610 0,385	1,584 0,392	1,598 1,598	Neutrale Stammlösung vor der Verdünnung 8 Stunden im Eis- schrank gestanden.
Pferdeblut 29	0,431 0,262	1,642 0,269	0,445 0,279	1,659 1,528	
Pferdehämo- globin 30	0,660 0,411	1,603			
Pferdehämo- globin 31, Lösung 1	0,741 0,444	1,667 0,457	0,721 0,455	1,579 1,509	Soda-alkalische Stammlösung über Nacht im Eisschrank gestanden.
Pferdehämo- globin 31, Lösung 2	1,115 0,698	1,598			Soda-alkalische Stammlösung über Nacht im Eisschrank gestanden.
Pferdehämo-gl. 32 Lösung I, 1	1,305 0,812	1,608			
Pferdehäm. 32, Lösung II, 1	1,378 0,877	1,572			Stammlösung soda-alkalisch.
Pferdehäm. 32, Lösung II, 2	1,031 0,656	1,572 0,660	1,040 0,660	1,584	"

Pferdehäm. 33, Lösung 1	$\frac{1,708}{1,059} = 1,613$ $\frac{1,621}{1,033} = 1,568$ $\frac{1,623}{1,028} = 1,579$			Stammlösung soda-alkalisch.
Pferdehäm. 33, Lösung 4		$\frac{1,637}{1,024} = 1,598$ $\frac{1,610}{1,041} = 1,547$		Soda-alkal. Stammlösg. vor d. Verdünnung 24 Std. i. Eissschrank gest.
Pferdehäm. 33, Lösung 5	$\frac{0,808}{0,505} = 1,598$			Soda-alkal. Stammlösg. vor d. Verdünnung 24 Std. i. Eissschrank gest.
Pferdehäm. 33, Lösung 6	$\frac{1,247}{0,797} = 1,564$ $\frac{1,243}{0,755} = 1,646^1$	$\frac{1,250}{0,778} = 1,579$		Soda-alkal. Stammlösg. vor d. Verdünnung 4 Tage i. Eissschrank gest.
Pferdehäm. 34, Lösung 2	$\frac{0,952}{0,599} = 1,591$			Stammlösung soda-alkalisch,
Pferdehäm. 35, Lösung 2	$\frac{1,628}{1,000} = 1,628$ $\frac{1,636}{1,024} = 1,597$ $\frac{1,580}{1,016} = 1,554$			Soda-alkal. Stammlösg. vor d. Verdünnung 11 Tage im Eissschr. gest.
Pferdehäm. 35, Lösung 3	$\frac{1,619}{1,019} = 1,589$	$\frac{1,694}{1,040} = 1,629$ $\frac{1,472}{0,994} = 1,482$ (11. Tag)		Stammlösung soda-alkalisch.
Pferdehäm. 37, Lösung 3	$\frac{0,905}{0,566} = 1,600$ $\frac{0,886}{0,554} = 1,600$ $\frac{0,894}{0,569} = 1,570$			Stammlösung soda-alkalisch.
Pferdehäm. 37, Lösung 4	$\frac{0,900}{0,562} = 1,601$	$\frac{0,872}{0,553} = 1,578$ $\frac{0,736}{0,499} = 1,476$ (11. Tag)		Soda-alkal. Stammlösg. vor d. Verdünnung 3 Tage i. Eissschrank gest.
Pferdehäm. 38, Lösung 4	$\frac{1,431}{1,899} = 1,592$	$\frac{1,218}{0,824} = 1,478$ (38. Tag)		Stammlösung soda-alkalisch.

18*

1) Offenbar falsche Ablesung im Nenner.

Tabelle VII (Fortsetzung).

Untersuchte Lösung	Die Untersuchung hat statgefunden:				Bemerkungen
	Sofort	Innerhalb 24 Stunden	Zwischender 24. u. 48. Std.	Zwischender 48. u. 96. Std.	
Pferdehäm. 39, Lösung 2	$\frac{1,297}{0,789} = 1,643$		$\frac{1,275}{0,788} = 1,618$	$\frac{1,305}{0,801} = 1,630$ (5. Tag)	Stammlösung soda-alkalisch.
Pferdehämoglobin 40, Lösung 3	$\frac{1,490}{0,927} = 1,607$			$\frac{1,256}{0,782} = 1,605$ (8. Tag) *)	*) 7 Tage am Eis, 1 Tag im Zimmer.
Pferdehämoglobin 41	$\frac{0,867}{0,539} = 1,610$			$\frac{1,236}{0,797} = 1,551$ (13. Tag)	
Pferdehämoglobin 42	$\frac{0,859}{0,530} = 1,620$			$\frac{0,954}{0,732} = 1,300$ (15. Tag)**)	***) 7 Tage am Eis, 8 Tage i. Zimmer.
Hundeblut 43		$\frac{0,762}{0,494} = 1,543$			Stammlösung soda-alkalisch.
Mittelwerte	1,601	1,580	1,568		Lebenswarmes Blut a. d. Carotis wurde direkt in einer Lösung von kohlensaurem Natron (0,1%) einfließen gelassen.

zirka 100 Fällen 9mal den Wert von 1,60, 8mal 1,61; andererseits aber auch Werte bis zu 1,52 heruntergehend.

Für den ersten Anblick könnte man mit vieler Wahrscheinlichkeit annehmen, daß es sich sowohl bei den höheren, als auch bei den niedrigeren Werten einfach um Ablesungsfehler handelt, die ja sicherlich nie vollkommen auszuschließen sind. Doch glaube ich eine andere Erklärung für diese Erscheinung angeben zu können.

In Tabelle VII habe ich die Ergebnisse der Bestimmungen zusammengestellt, die ich an einer größeren Anzahl von Blut- resp. Hämoglobinlösungen vom Hund und vom Pferd ausgeführt habe.

Weitaus die meisten Lösungen wurden sofort, d. i. innerhalb 15 Minuten nach Herstellung der soda-alkalischen Lösungen untersucht; ein Teil wurde ein zweites, drittes Mal usw. nach mehreren Stunden, oder am nächsten, am zweitnächsten Tag und auch später geprüft. In einzelnen Versuchsreihen ist aus äußeren Gründen die sofortige Untersuchung unterblieben und konnte erst am nächsten Tag vorgenommen werden. Die so erhaltenen Werte sind, je nachdem sie „sofort“ oder innerhalb der ersten, der zweiten 24 Stunden usw. erhalten wurden, in einzelne Stäbe der Tabelle eingereiht. Aus Tabelle VII ist ohne weiteres ersichtlich, daß die Quotienten im Stab „sofort“ erheblich größer sind, als in den übrigen; daß also meistens innerhalb 24 Stunden, zuweilen erst später eine Erniedrigung derselben stattfindet. (In Lösungen, die „sofort“ überhaupt nicht untersucht wurden, setzt der Quotient gleich mit einem geringeren Wert an.)

Vergleicht man nun die Mittelwerte am Fußende der Tabelle VII, so ergibt sich das interessante Resultat, daß in den Lösungen, die nicht „sofort“, jedoch immerhin noch innerhalb der ersten 24 Stunden (in der Regel waren bloß eine Nacht, oder gar einige Stunden dazwischen, während deren die Lösung im Eisschrank gestanden hatte) geprüft wurden, der mittlere Quotient den Wert 1,580 hat, also beinahe genau dasselbe, was Hüfner und später Butterfield, Letsche gefunden hatten; sogar zwischen der 24. und 48. Stunde war der Wert annähernd so groß: 1,568.

Im Gegensatz hierzu beträgt der Mittelwert in den „so-

fort“ untersuchten Lösungen 1,601. Sehe ich bei der Berechnung des Mittelwertes von Hundeblut und Hämoglobin 19 ab, die sich durchaus verschieden von den übrigen Lösungen verhielten und vielleicht irgendeine Verunreinigung, z. B. bei der Blutentnahme, erlitten haben, so erhalte ich 1,606.

Bei solchem Stand der Dinge läßt sich mit Sicherheit sagen, daß in der frisch hergestellten soda-alkalischen Lösung des Oxyhämoglobins der Quotient der Extinktionskoeffizienten an den genannten Spektralstellen tatsächlich etwas über 1,60 beträgt. Dieser Wert sinkt aber bereits innerhalb der ersten 24 Stunden offenbar infolge gewisser Umsetzungen, die das Oxyhämoglobin erfährt und die eine Veränderung in seinem optischen Verhalten zur Folge haben.

Auf die Möglichkeit einer solchen Veränderung hat schon Bohr¹⁾ hingewiesen, und daß Umsetzungen sehr rasch erfolgen können, hatte auch Hüfner²⁾ beobachtet: Blut, das am Vormittag die richtige Menge Sauerstoff gefunden hatte, wies, nachdem es über Mittag am Eis gestanden hatte, bereits ein verringertes Bindungsvermögen auf.

Der Umstand, daß ähnlich hohe Werte, wie S. 273 erwähnt war, auch bei Butterfield und anderen Autoren vorkommen, ist wahrscheinlich so zu erklären, daß es sich gerade in diesen Fällen um „sofort“ untersuchte Lösungen handelt; zu diesen sind auch diejenigen zu zählen, in denen er 1,59 erhielt (17 von 74 Fällen). In seinen übrigen Fällen dürfte die Lösung kürzer oder länger ($\frac{1}{2}$ bis 1 Tag) — wenn auch im Eisschrank — gestanden haben, was nach meinen Ergebnissen bereits eine Verringerung des Quotienten zur Folge haben kann.

(Hierauf weist auch der Umstand hin, daß Butterfield in 8 von 74 Fällen 1,56, 3mal gar 1,55 erhalten hatte.)

Für die Tatsache, daß die Werte für das Absorptionsverhältnis im Zwischenraum zwischen beiden Streifen, die Butterfield und ich erhielten, beinahe identisch, die Quotienten jedoch um etwa 2⁰/₁₀ verschieden sind, habe ich bereits

¹⁾ Christian Bohr, Über den spezifischen Sauerstoffgehalt des Blutes. Skandin. Archiv 3, 108, 1892.

²⁾ G. Hüfner, Noch einmal die Frage nach der Sauerstoffkapazität des Blutes. Archiv f. (Anat. u.) Physiol. 1903.

S. 267 den Umstand verantwortlich gemacht, daß die Lichtabsorption im Bereich des zweiten Streifens von Butterfield und mir nicht gleich hoch gefunden wurden. Aus Obigem läßt

Tabelle VIII.

		Extinktionskoeffizienten festgestellt			
		Sofort	Innerhalb 24 Stunden	Zwischen der 24. und 48. Stunde	Zwischen der 48. und 96. Stunde
Hundeblut 18, Lösung 1	2. Streifen, Zwischenraum	0,716 0,447	0,689 0,444		
Hundehämoglobin 19, Lösung 2	2. Streifen, Zwischenraum	0,892 0,566	0,881 0,556		
Hundehämoglobin 25	2. Streifen, Zwischenraum	0,755 0,470	0,720 0,468		
Hundeblut 26	2. Streifen, Zwischenraum	0,697 0,422	0,671 0,432	0,662 0,426	
" 28	2. Streifen, Zwischenraum	0,740 0,465	0,702 0,434	0,714 0,452	
Hundehämoglobin 28	2. Streifen, Zwischenraum		0,610 0,385	0,627 0,392	
Pferdeblut 29	2. Streifen, Zwischenraum	0,431 0,262	0,445 0,269	0,419 0,274	
Pferdehämoglobin 31, Lösung 1	2. Streifen, Zwischenraum	0,741 0,444	0,721 0,457	0,687 0,455	
Pferdehämoglobin 32, Lösung II. 2	2. Streifen, Zwischenraum	1,031 0,656	1,040 0,660		
Pferdehämoglobin 33, Lösung 1	2. Streifen, Zwischenraum	1,708 1,059	1,621 1,033	1,623 1,028	
Pferdehämoglobin 33, Lösung 4	2. Streifen, Zwischenraum			1,637 1,024	1,610 1,041
Pferdehämoglobin 33, Lösung 6	2. Streifen, Zwischenraum		1,247 0,797	1,243 0,755	1,230 0,778
Pferdehämoglobin 35, Lösung 2	2. Streifen, Zwischenraum	1,623 1,000	1,636 1,024	1,580 1,016	
Pferdehämoglobin 35, Lösung 3	2. Streifen, Zwischenraum	1,619 1,019			1,694 1,040
Pferdehämoglobin 37, Lösung 3	2. Streifen, Zwischenraum	0,905 0,566	0,886 0,554	0,894 0,569	
Pferdehämoglobin 37, Lösung 4	2. Streifen, Zwischenraum	0,900 0,562			0,872 0,553
Pferdehämoglobin 39, Lösung 2	2. Streifen, Zwischenraum	1,297 0,789		1,275 0,788	

sich schon vermuten, daß es das Verhalten der Absorption in Grün ist, die den Unterschied, ob „sofort“ oder nach längerem Stehen der Lösung untersucht wurde, ausmacht.

Daß dem in der Tat so ist, ergibt sich aus Tabelle VIII, in der die Extinktionskoeffizienten in allen Versuchsreihen zusammengestellt sind, in der eine Lösung in Intervallen von mehreren Tagen öfter untersucht wurde.

Aus Tabelle VIII ist sofort ersichtlich, daß sich der Extinktionskoeffizient im Zwischenraum auch nach tagelangem Stehen in der Regel nur wenig und meistens bloß innerhalb der Grenzen der unvermeidlichen Versuchsfehler verändert. Im Gegensatz hierzu zeigt der Extinktionskoeffizient in Grün in der Regel eine mehr oder minder starke Abnahme im Laufe der Tage. Besonders ausgeprägt ist das verschiedene Verhalten der Extinktionskoeffizienten in beiden Spektralbereichen an Pferdehäoglobin 31 Lösung 1, Hundeblood 26, und Hundeblood 25. Die größere Inkonzanz im zweiten Streifen ist schon Aron und Müller¹⁾ aufgefallen.

Wenn dem so ist, wird es auch sofort verständlich, daß das Absorptionsverhältnis im Zwischenraum zwischen beiden Absorptionsstreifen, von Butterfield und mir festgestellt, denselben Wert hat; während am zweiten Streifen, wo die Lichtabsorption im Laufe der Tage weit rascher abnimmt, ich den Extinktionskoeffizienten größer, daher das Absorptionsverhältnis kleiner finden mußte als Butterfield, eben, weil ich an ganz frischen Lösungen „sofort“ untersucht habe. Und zwar sowohl in den S. 254 angeführten 7 Versuchen, in denen die Absorptionsverhältnisse bestimmt wurden, als auch in weitaus den meisten übrigen Versuchen, in denen ich bloß die Extinktionskoeffizienten und deren Quotienten ermittelte (Tabelle VI).

VI. Methämoglobinbildung in Lösungen des Oxyhämoglobins. Daß sich das Oxyhämoglobin verhältnismäßig rasch in Methämoglobin umsetzen kann, ist längst bekannt. Das ist ja auch der Grund, warum eine reine Lösung von Oxyhämoglobin nur aus dem frisch abgepreßten, feuchten Krystallkuchen bereitet werden kann, und nicht etwa aus den getrockneten Krystallen. Dieselbe Umsetzung findet auch in Blut,

¹⁾ l. c. 1906.

resp. in Oxyhämoglobinlösungen statt, wenn man diese bei Zimmertemperatur stehen läßt oder längere Zeit hindurch im Eisschrank aufbewahrt. Diese Umsetzung wird vielfach als Bakterienwirkung aufgefaßt.

Da nun der Quotient in einer soda-alkalischen Lösung (hier handelt es sich immer um solche) von Methämoglobin bloß zirka 1,20 beträgt, so ist es klar, daß in Lösungen von Oxyhämoglobin, die auch Methämoglobin enthalten, der Quotient einen Wert annehmen muß, der zwischen 1,60 und 1,20 liegt. Darum hatte Hüfner in allen Fällen, wo der Quotient in den von ihm zu seinen Gasbindungsversuchen vorbereiteten Lösungen wesentlich geringer als 1,55 war, angenommen, daß sie zersetzt waren, Methämoglobin enthielten, und zu seinen Versuchen nicht verwendet.

Es fragt sich nun, ob die Veränderung im optischen Verhalten des Hämoglobins, das nach meinen Versuchen bereits nach mehrstündigem Stehen der Lösung im Eisschrank eintreten kann, tatsächlich auf einer Bildung von Methämoglobin beruht?

Ich habe versucht, den Nachweis, daß es sich um Methämoglobin handelt, auf dem Wege der Spektrophotometrie zu erbringen und zwar am roten Spektralende, als in einem Spektralgebiet, in dem sich das Methämoglobin am ehesten vom Oxyhämoglobin unterscheiden läßt. In einem Teil der Lösungen, die im Gebiet der Absorptionsstreifen untersucht und an denen obige Ergebnisse erhalten wurden, habe ich die Extinktionskoeffizienten im roten Ende des Spektrums nicht nur an der frisch bereiteten Lösung bestimmt, sondern wiederholt auch, nachdem sie tage- und auch wochenlang im Eisschrank gestanden haben.

Wie aus Tabelle IX ersichtlich, nimmt die Lichtabsorption in Lösungen von Oxyhämoglobin während des Stehens im Eisschrank anfangs langsamer, später rascher zu. Dies Verhalten der Lösung deckt sich vollkommen mit der Tatsache, daß in der alkalischen Lösung des Methämoglobins kein Streifen in Rot zu sehen ist, wohl aber ein sogenannter „Vorschlagschatten“ rotwärts von den ersten Absorptionsstreifen in Gelb. Auch das Verhalten der Extinktionskoeffizienten im Zwischenraum zwischen den Absorptionsstreifen und am zweiten Ab-

Tabelle IX.

Spezifische Extinktionskoeffizienten $\times 10^4$.

Lösung	Am wievielen Tage nach Bereitung der Lösung untersucht?	Spektralgebiet ¹⁾ , in dem die Untersuchung stattfind; $\mu\mu$					
		648,8	635,0	622,0	614,5	607,5	602,9
Pferdehämo- globin 35, Lösung 1	1	52,8	54,6	119	191	296	429
	6	75,4	107	157	215	320	456
	10	80,5	99,1	175	225	329	477
	16	—	114	185	236	388	505
	54	—	180	290	385	572	686
Pferdehämo- globin 37, Lösung 2	1	52,0	67,8	112	151	242	357
	2	57,2	68,8	119	168	258	380
	7	—	77,3	123	166	269	376
	29	96,1	149	210	267	377	524
Pferdehämo- globin 38, Lösung 3	1	54,5	74,3	115	166	252	331
	2	49,6	92,1	113	155	243	336
	7	—	175	239	281	—	—
Pferdehämo- globin 39, Lösung 1	1	—	—	—	—	—	—
	5	—	74,0	128	168	—	—
	14	—	90,9	140	194	—	—

sorptionsstreifen (S. 253) zeugt für die Anwesenheit wachsender Mengen von Methämoglobin in Lösungen, die längere Zeit gestanden hatten; bekanntlich ist die Lichtabsorption des Methämoglobins im Zwischenraum nahezu dieselbe wie die des Oxyhämoglobins, am zweiten Absorptionsstreifen jedoch wesentlich geringer.

Also glaube ich mit hinreichender Sicherheit erwiesen zu haben, daß die Veränderung, die im optischen Verhalten des Oxyhämoglobins sehr rasch einsetzt, tatsächlich auf der Bildung von Methämoglobin beruht. Es fragt sich nun, wodurch diese Umsetzung veranlaßt wird?

Außer dem vielfach erwiesenen Einfluß der Eintrocknung, des Lichtes usw. (von Methämoglobin bildenden Giften sei hier gänzlich abgesehen) wird diese Umsetzung, wie bereits erwähnt, vielfach Bakterien zugeschrieben.

Um Klarheit über diesen Punkt zu gewinnen, hat auf meine Bitte Herr Dr. D. Aczél, Assistent am hierortigen hygienischen Universitätsinstitut — dem ich an dieser Stelle bestens

¹⁾ Diese Ziffern bedeuten die Wellenlänge der Strahlen, die die Mitte des Gesichtsfeldes eingenommen haben.

danke — einige der von mir untersuchten Lösungen einige Tage, nachdem die Beobachtungen an ihnen abgeschlossen waren, auf Anwesenheit von Bakterien geprüft. Und zwar wurden hierzu gerade diejenigen Lösungen ausersehen, an denen das Sinken des Quotienten im Laufe der Tage und Wochen laut Tabelle VIII verzeichnet ist. (Bemerken muß ich, daß sämtliche Lösungen auch nach wochenlangem Stehen krystallklar und geruchlos geblieben waren, wie am Tage der Bereitung!) Von jeder Lösung wurde je dreimal auf Bouillon geimpft, und je zwei Bouillonproben im Thermostaten bei Bruttemperatur, je eine bei Zimmertemperatur stehen gelassen. In nachstehender Zusammenstellung wurden die Lösungen nur dann als „steril“ erkannt, wenn die Bouillon in allen drei zugehörigen Eproutetten 3 Tage später noch ganz klar geblieben war.

Es stellte sich heraus, daß die

Lösungen	mit den stark abnehmenden Quotienten	
35. Lösung 3	1,589, 1,629, 1,481	} steril waren,
37. „ 4	1,601, 1,578, 1,476	
48. „ 4	1,592, 1,478	
37. Lösung 3	1,600, 1,600, 1,570, 1,583, 1,419,	} infiziert
39, „ 2	1,643, 1,618, 1,630, 1,605, 1,551, 1,300	

daß also unabhängig davon, ob die Lösung steril war oder nicht, Methämoglobinbildung eintrat. Zum Überfluß wurden von den beiden letztangeführten Lösungen, deren Bouillon sich trübte, Agarplatten gegossen, auf denen sich nach einigen Tagen 1 bis 2 ganz oberflächlich gelagerte Luftbakterienkolonien entwickelt haben.

Zur Methämoglobinbildung in soda-alkalischen Lösungen des Oxyhämoglobins bedarf es daher nicht der Mitwirkung von Bakterien.

Was die sonstigen Bedingungen der Methämoglobinbildung anbelangt, sei noch folgendes bemerkt:

Das Sinken des Quotienten, das wir eben der Methämoglobinbildung zuschrieben, wurde in Lösungen von höchstens 0,1 bis 0,3% Gehalt beobachtet, (denn nur solche sind ja im Gebiet der Absorptionsstreifen spektrophotometrisch prüfbar). Nun finden sich in Tabelle VI mehrere Versuchsreihen, bei denen vermerkt ist, daß die Stammlösung von der Verdünnung längere Zeit am Eis gestanden hatte. Untersuchte ich dann die Lösung „so-

fort“ nach erfolgter Verdünnung, so war der Quotient ebenfalls zirka 1,60, ebenso wie an anderen, aus der frischen Stammlösung bereiteten und untersuchten Lösungen. Daraus ließe sich entweder folgern, daß die Umsetzung in konzentrierten Lösungen weit langsamer vor sich geht als in verdünnteren, oder aber, daß die Umsetzung auch in der konzentrierten Lösung erfolgt, jedoch durch die Verdünnung mit der 0,1⁰/₀igen Lösung von Natriumcarbonat wieder rückgängig gemacht wird. Für letztere Annahme spricht der Umstand, daß die Veränderung in der Lichtabsorption, die ich am roten Spektralende, S. 243, beschrieben habe, ja gerade an den konzentrierten Stammlösungen beobachtet wurde. Man hätte es also hier mit einem reversiblen Vorgang zu tun; was auch so manches, was von verschiedener Seite beschrieben wurde, erklären könnte. So z. B. die Rückverwandlung des Methämoglobins in Oxyhämoglobin durch Schütteln mit Luft; ferner die angebliche Anwesenheit geringer Mengen von Methämoglobin im kreisenden, normalen Blut.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in folgendem zusammenfassen:

1. An soda-alkalischen Lösungen von Oxyhämoglobin ist das Absorptionsverhältnis im Zwischenraum zwischen beiden Streifen, bei 565,8 bis 555,9 $\mu\mu$ = 0,001884, also genau dasselbe, was **Butterfield** fand, und etwa um 10⁰/₀ mehr als von **Hüfner** festgestellt wurde.

2. Das Absorptionsverhältnis am zweiten Streifen ist bei 541,6 bis 533,1 $\mu\mu$ = 0,001168, also geringer, als es von **Butterfield** und weit geringer, als es von **Hüfner** gefunden wurde.

3. Der Quotient der Absorptionsverhältnisse resp. der Extinktionskoeffizienten beträgt an ganz frisch untersuchten Lösungen etwas über 1,60, also mehr als **Hüfner**, **Butterfield** und andere gefunden haben; nach kurzem Stehen (auch bei Eisschranktemperatur) der Lösung sinkt der Quotient innerhalb der ersten 24 Stunden auf den von den genannten Autoren gefundenen Wert von 1,58, später noch tiefer.

4. Hüfners Angabe, daß das Absorptionsverhältnis, sowie die genannten Quotienten konstante Werte darstellen, die für den Farbstoff Oxyhämoglobin charakteristisch sind, wird vollinhaltlich bestätigt.

5. Das Sinken der Quotienten beruht auf einer Bildung von Methämoglobin, die aber auch ohne Mitwirkung von Bakterien stattfindet.

6. Zu einer vergleichenden Darstellung des Ganges der Lichtabsorption wird vorgeschlagen, die Extinktionskoeffizienten, die an verschiedenen konzentrierten Lösungen festgestellt werden, auf die einheitliche Konzentration von 0,1% Farbstoffgehalt zu reduzieren und diese Werte als spezifische Extinktionskoeffizienten zu bezeichnen. Trägt man diese in ein Koordinatensystem als Ordinaten, die Wellenlänge als Abszissen ein, so erhält man Kurven, die den Farbstoff eindeutig charakterisieren.

Wasserstoffzahl und Sauerstoffbindung des Blutes.

Von

K. A. Hasselbalch.

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

(Eingegangen am 9. April 1917.)

Die Berechnung der Wasserstoffzahl des Blutes aus den Mengen der freien und der gebundenen Kohlensäure desselben ist, wie ich schon früher¹⁾ hervorgehoben habe, ein direkterer und deshalb vorzuziehender Weg zur Feststellung der Blutreaktion als die von Barcroft²⁾ und seinen Schülern benutzte Sauerstoffbindungsmethode. Letztere Methode geht bekanntlich von der (feststehenden) Voraussetzung aus, daß die O₂-Bindungskurve des Blutes bei saurer Reaktion herabgedrückt wird. In einem Falle, nämlich in Barcrofts eigenem Blute, wurde von Peters³⁾ bei variiertem CO₂-Spannung die Reaktion elektrometrisch bestimmt und zwischen p_H (= - log C_H) des Blutes und dem negativen Logarithmus der O₂-Bindungskonstante *K* der Hillschen Formel⁴⁾ eine einfache Beziehung vorgefunden, indem in einer graphischen Darstellung letztere Größe eine geradlinige Funktion der ersten ist (siehe Fig. 1).

Sollte es sich hier um einen Befund gesetzmäßiger Natur handeln, so wäre es ja möglich, die Peters-Barcroftsche Kurve für die Reaktionsbestimmung des Blutes anderer Menschen zu verwenden, indem die Größe der Konstante *K* bei alveolarer CO₂-Spannung einer an der Kurve abzulesenden aktuellen Reaktion des betreffenden Blutes entspräche. Zu meiner Überraschung

¹⁾ Diese Zeitschr. 78, 140, 1916.

²⁾ The respiratory function of the blood, Cambridge 1914.

³⁾ l. c. S. 316.

⁴⁾ $\frac{y}{100} = \frac{K \cdot x^{2.5}}{1 + K \cdot x^{2.5}}$ (*y* = %ische O₂-Sättigung, *x* = O₂-Druck.

Die Formel kann vielleicht einfacher $\frac{y}{100 - y} = K \cdot x^{2.5}$ geschrieben werden.

fand ich¹⁾ bei 6 anderen Personen eine recht genaue Übereinstimmung mit der Peters-Barcroft'schen Kurve („P.-B.-Kurve“), jedenfalls waren die Abweichungen so geringfügig, daß ich geneigt bin, die P.-B.-Kurve als regelmäßigen physiologischen Befund anzusehen.

Indessen habe ich schon früher²⁾ mehrere Beobachtungen anderer Forscher hervorgehoben, die mit der allgemeinen Geltung der „P.-B.-Kurve“ unvereinbar sind. Im Blute von Haldane und in dem von Douglas muß die Kurve normalerweise bedeutend höher, bei Higgins während einer Periode von Kohlenhydratkarenz sehr bedeutend niedriger als bei Barcroft gelegen sein. Die Verschiebungen gegen die P.-B.-Kurve sind in diesen Fällen so verhältnismäßig enorm — um etwa 0,2 (siehe Fig. 1) — daß sie weit außerhalb jedes denkbaren Fehlerbereiches fallen.

Ich vermute, daß künftig jedermann, der die Reaktion des Blutes bestimmen will, die CO₂-Bindung und nicht die O₂-Bindung desselben dafür verwerten wird. In Betracht der vielen, bereits in der Literatur vorliegenden Versuche, die Reaktion des Blutes mittels der O₂-Bindung desselben zu beurteilen, und wegen des selbständigen Interesses, das mit der gegenseitigen Beziehung von p_H und log *K* des Blutes verknüpft ist, habe ich es doch angezeigt gefunden, die Sachlage in einigen pathologischen Fällen näher zu prüfen.

Es wurden im ganzen 8 Patienten³⁾ untersucht, und zwar in der Weise, daß etwa 30 ccm Arinvenenblut sofort defibriniert und auf Eis gestellt, dann möglichst schnell, im Laufe weniger Stunden portionsweise bei 37° mit Luftmischungen passender CO₂- und O₂-Spannungen gesättigt und im Quecksilbervakuum ausgepumpt wurden. Einzelheiten der Technik sowie die Art der Berechnung sind in der obenerwähnten Arbeit von mir angegeben. Hier bemerke ich nur, daß bei dieser Gelegenheit, wo es auf die möglichst genaue Bestimmung der prozentischen O₂-Sättigung ankam, die O₂-Kapazität des Blutes

¹⁾ l. c. S. 134.

²⁾ l. c. S. 133.

³⁾ Herrn Oberarzt Dr. Bing, aus dessen Abteilung am hiesigen Bispebjärg-Hospital das Material größtenteils stammt, sei für bereitwillige Hilfe auch an diesem Ort herzlich gedankt.

nicht nur colorimetrisch, sondern gewöhnlich auch durch Sättigung mit atmosphärischer Luft und Auspumpen festgestellt wurde. Die Übereinstimmung zwischen den Angaben der beiden Methoden war immer vorzüglich.

A. In 4 Fällen, also bei der Hälfte der untersuchten Patienten, ergab sich eine ebenso gute Übereinstimmung mit der Peters-Barcroftschen Kurve, wie bei den 6 von mir bisher untersuchten Personen.

Die klinischen Diagnosen waren:

1. Neurasthenia, Rheumatismus chronicus,
2. Tuberculosis glandularum,
3. Arterielle Hypertension,
4. Anaemia perniciosa, tumor lienis.

Ich unterlasse eine Präsentation des nicht viel aussagen- den Zahlenmaterials. Die Untersuchungen bekräftigen den schon gewonnenen Eindruck, daß die Peters-Barcroftsche Abhängigkeit im menschlichen Blut eine sehr verbreitete Geltung hat. Nur die experimentellen Ergebnisse von Fall IV seien hier mitgeteilt, erstens weil die oben behauptete Übereinstimmung mit der P.-B.-Kurve hier am schlechtesten ausgesprochen ist, zweitens weil sie einen recht extremen Grad von Hämoglobinarmut betreffen.

Tabelle I. Fall IV. 50jährige Frau. Anaemia perniciosa. Tumor lienis.

mm CO ₂	mm O ₂	Vol.-% gebunden		pH	% O ₂ -Sättigung	— log K
		CO ₂	O ₂			
1,5	140,0	33,0	4,57	8,61	100	—
27,4	20,0	54,8	2,13	7,54	46,6	3,31
39,7	30,7	58,3	2,88	7,40	63,0	3,49
62,6	32,3	62,3	2,32	7,23	50,9	3,76

Bei einem Zustand, wo der Hämoglobingehalt des Blutes nur 25 % der Norm beträgt, wäre es für die Sauerstoffversorgung des Organismus von augenscheinlichem Vorteil gewesen, die Sauerstoffverbindung des Hämoglobins womöglich zu lockern und dabei die Sauerstoffabgabe an die Gewebe zu erleichtern, kurzum die Werte von — log K zu vergrößern, die P.-B.-Kurve nach oben hin zu verschieben. Eine solche Verschiebung ist aber nur andeutungsweise vorhanden. Zwar liegen alle drei Bestimmungen (Fig. 1) oberhalb der P.-B.-Kurve, zwei davon

jedoch nur so wenig, daß die Abweichungen an die Grenze des Fehlerbereiches fallen.

Handelt es sich hier um eine rechte Verschiebung der P.-B.-Kurve nach oben, so ist sie jedenfalls nur halb so groß wie in dem normalen Blute von Haldane oder Douglas. Die Möglichkeit, daß hier eine anämiekompensierende Vorrichtung vorliegt, ist somit sehr gering.

Experimentell kann, wie ich mehrmals konstatiert habe, eine große Verschiebung der P.-B.-Kurve nach oben durch Zusatz von großen NaCl-Mengen zum Blute in vitro hervorgerufen werden. Wasserzusatz drückt umgekehrt die P.-B.-Kurve herunter.

B. In den übrigen 4 Fällen war die Nichtübereinstimmung mit der Peters-Barcroftschen Gesetzmäßigkeit ganz zweifellos, und zwar wurden in allen Fällen große Abweichungen nach unten hin festgestellt, Abweichungen nach derselben Richtung und von derselben Größenordnung, wie in dem oben erwähnten Versuche mit Higgins bei Kohlenhydratkarenz.

Fall V betrifft eine 68jährige Frau, die, seit 3 Jahren an Nephritis leidend, in komatösem Zustand mit Anurie und Erbrechen, plötzlich einsetzender Amaurose und in Krämpfen eingebracht und am Tage danach untersucht wurde. Im Augenblick der Blutentnahme war schon eine unzweifelhafte Besserung eingetreten, der Zustand war jedoch noch halb komatös, außerdem durch Anurie und fast vollkommene Amaurose gekennzeichnet. Die Blutuntersuchung ergab das folgende Bild (Tabelle II, Figur 2).

Tabelle II. Fall V. Urämie.

mm CO ₂	mm O ₂	Vol.%, gebunden		pH	% O ₂ -Sättigung	-log K
		CO ₂	O ₂			
1,5	ca. 140,0	14,4	15,8	8,29	100	—
21,8	30,2	41,0	13,1	7,53	83,0	3,01
17,3	23,5	38,1	11,3	7,60	71,9	3,02
39,5	32,9	50,4	11,6	7,35	73,6	3,35
68,7	42,9	59,7	12,3	7,17	77,8	3,54

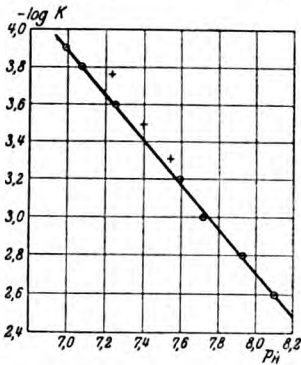


Fig. 1. o Blut von Barcroft („P.-B.-Kurve“). + Blut von Fall IV, Anaemia perniciosa.

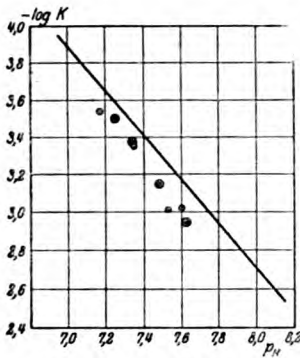


Fig. 2. Chronische Nephritis.
 ⊙ Im urämischen Coma,
 ⊙ Später, in Genesung.

Fig. 2 ist eine graphische Darstellung der Versuchsergebnisse, wo gleichzeitig der normale Verlauf und die normale Lage der P.-B.-Kurve angegeben sind.

Man sieht, daß in diesem Fall eine p_H -Bestimmung im Blute mittels der P.-B.-Kurve ganz irreführend sein würde; ganz wie bei Higgins (bei Kohlenhydratkarenz, s. o.) würden die auf diese Weise gewonnenen p_H -Werte viel zu alkalisch ausfallen. Z. B. ist hier bei 39,5 mm- CO_2 (s. Tab. II) der negative Logarithmus der O_2 -Bindungskonstante 3,35; nach der P.-B.-Kurve bestimmt, sollte somit p_H 7,45 betragen; in Wirklichkeit ist p_H 7,35, usw.

8 Tage später wurde bei derselben Patientin, die nun in ausgesprochener Genesung war, die Untersuchung wiederholt und ergab (Tab. IIa) die gleichfalls auf Fig. II eingetragenen Werte, die augenscheinlich derselben abnorm niedrig gelegenen Kurve angehörig sind.

Tabelle IIa. Fall V. In Genesung.

mm CO_2	mm O_2	Vol.-% gebunden		p_H	% O_2 -Sättigung	— log K
		CO_2	O_2			
1,5	ca. 140,0	19,3	13,7	8,41	100	—
18,7	24,5	43,1	10,55	7,63	76,9	2,95
28,5	29,5	49,4	10,6	7,485	77,0	3,15
45,0	31,5	56,6	9,7	7,34	70,5	3,37
58,9	32,5	60,9	8,95	7,25	65,2	3,51

Man darf daraus wohl schließen, daß der urämische Anfall für den abweichenden Befund der Blutuntersuchung ohne Bedeutung gewesen ist, daß aber vielleicht die zugrunde liegende chronische Nephritis daran schuld ist.

Bei Fall VI handelte es sich um einen Diabetiker, der wegen Acidosis $2\frac{1}{2}$ Tage lang gehungert hatte. Die Beobachtungen finden sich in der Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III. Fall VI. 49jähriger Mann mit Diabetes mellitus; Inanition seit $2\frac{1}{2}$ Tagen.

mm CO ₂	mm O ₂	Vol.-% gebunden		p _H	% O ₂ -Sättigung	- log K
		CO ₂	O ₂			
1,5	ca. 140,0	8,7	21,5	8,09	100	—
20,4	13,5	37,9	8,9	7,53	41,45	2,98
38,3	30,6	46,2	16,3	7,33	75,7	3,22
62,9	32,3	56,6	14,8	7,19	68,85	3,43

Bei dem hungernden Diabetiker finden wir wieder (Fig. 3) eine der P.-B.-Kurve fast parallele Verschiebung der log-K-Werte nach unten. Bei einer CO₂-Spannung von 38,3 mm (Tab. III), wo p_H des Blutes in Wirklichkeit 7,33 beträgt, würde die Benutzung der P.-B.-Kurve zu einem viel alkalischeren Werte, 7,56, leiten.

Eine fast ebenso große Verschiebung nach unten findet bei dem nächsten Patienten (Fall VII, Tab. IV, Fig. 3) statt, der an Arthritis urica litt. Bemerkenswerterweise lebte der Patient seiner Krankheit wegen von lacto-vegetabilischer Kost.

Tabelle IV. Fall VII. 46 jähriger Mann mit Arthritis urica. O₂-Kapazität des Blutes colorimetrisch 19,4 Vol.-%.

mm CO ₂	mm O ₂	Vol.-% gebunden		p _H	% O ₂ -Sättigung	- log K
		CO ₂	O ₂			
1,5	ca. 140,0	9,0	19,3	—	100	—
3,3	35,0	20,0	18,7	8,07	96,9	2,36
33,3	34,2	45,4	15,2	7,38	79,95	3,26

Nicht nur die Lage, sondern auch die Richtung der betrachteten geradlinigen Funktion scheint (pathologischen?) Variationen unterworfen zu sein. In Tabelle V und auf Fig. 4 sind die Ergebnisse der Untersuchung eines zweiten Nephritikers registriert worden.

Tabelle V. Fall VIII. 42 jähriger Mann. Nephritis chronica. Sauerstoffkapazität des Blutes (colorimetrisch) **23,3** Vol.-%.

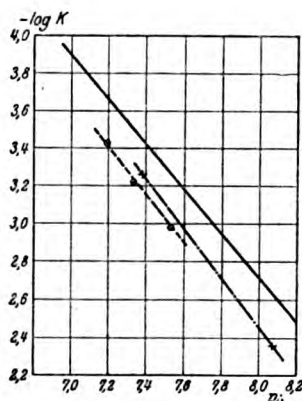


Fig. 3. ○ Hungernder Diabetiker. + Uratiker.

mm CO ₂	mm O ₂	Vol.-%, gebunden		pH	% O ₂ -Sättigung	- log K
		CO ₂	O ₂			
9,3	19,1	27,2	17,9	7,75	76,7	2,68
37,7	28,4	50,2	15,4	7,37	65,9	3,34
63,7	32,0	61,0	13,4	7,21	57,6	3,63

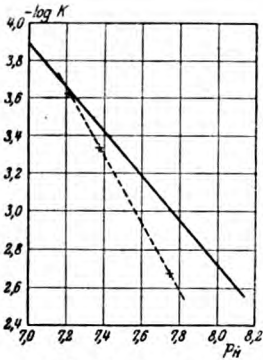


Fig. 4. Chronische Nephritis.

Wie ersichtlich, handelt es sich hier um einen von der P.-B.-Kurve abweichenden Verlauf der log K-Kurve, indem bei alkalischer Reaktion die O₂-Bindung dieses Blutes fester, bei saurer Reaktion anscheinend loser ist als bei Barcrofts Blut.

Die 4 unter B erwähnten pathologischen Fälle sind also dadurch gekennzeichnet, daß die in Barcrofts Blut von Barcroft und Peters und im Blute von 10 anderen Personen von mir konstatierte Ge-

setzmäßigkeit, die darin besteht, daß einer bestimmten Größe der O₂-Bindungskonstante K eine gegebene aktuelle Reaktion des Blutes entspricht, nicht zutrifft. Die notwendige Schlußfolgerung, daß für die exakte Bestimmung der aktuellen Blutreaktion die Barcroftsche O₂-Bindungsmethode nicht allgemein verwendbar ist, scheint mir weniger interessant als die Frage, durch welchen Mechanismus die abnorme Relation zwischen Wasserstoffzahl und Sauerstoffbindung des Blutes sich eingestellt hat. Diese Frage kann ich vorläufig nicht bestimmt beantworten, sondern muß mich auf die oben gegebene Andeutung beschränken, daß die starken Blutelektrolyte in dieser Beziehung nicht ohne Bedeutung sind.

Studien zur Chemie und Physiologie der Blutgerinnung.

III.

Von

E. Herzfeld und R. Klinger.

(Aus dem chemischen Laboratorium der med. Klinik und aus dem
Hygiene-Institut der Universität Zürich.)

[Eingegangen am 11. April 1917.]

In unserer letzten Mitteilung wurde die Thrombinbildung näher untersucht und im wesentlichen auf eine Proteolyse zurückgeführt, in deren Verlauf gewisse polypeptidartige Eiweißabbauprodukte auftreten; diese stellen in Form ihrer CaCl_2 -Salzverbindung das Thrombin dar. Wir möchten im folgenden auf eine Reihe weiterer, teils bekannter, teils neuer Tatsachen eingehen und mit ihrer Hilfe die von uns entwickelte Auffassung des Gerinnungsvorganges vertiefen und in manchen Einzelheiten ergänzen.

An dieser Stelle erscheint es angebracht, die bisherige Nomenklatur, die wir zunächst von früheren Untersuchern beibehalten hatten, etwas zu modifizieren. Das Bedürfnis nach einer Vereinfachung ist auf diesem Gebiete gewiß vorhanden; auch ist die ältere Namengebung, die fast ganz durch die Annahme fermentativer Prozesse bestimmt worden war, veraltet. Wir werden im folgenden nur noch fünf Ausdrücke benutzen, die zum größten Teil bereits eingebürgert sind: Das Fibrinogen geht durch Adsorption von Thrombin in Fibrin über. Das Thrombin entsteht aus gewissen Substanzen des Plasmas, auf die wir sofort näher eingehen werden und die wir als „Prothrombin“ bezeichnen. Die Umwandlung des Prothrombins

in Thrombin kann durch viele Körper beschleunigt werden; wir nennen diese Gruppe die Aktivatoren und verstehen darunter sowohl chemisch wie physikalisch-chemisch wirkende Substanzen. Übersichtlich dargestellt, reduziert sich der Gerinnungsvorgang somit auf folgende zwei Formeln:

1. Prothrombin \longrightarrow Proteolyse (bei CaCl_2 -Anwesenheit, durch Aktivatoren beschleunigt) \longrightarrow Thrombin.
2. Thrombin + Fibrinogen = Fibrin.

Es sei noch erwähnt, daß wir unter „Pro“-Thrombin wörtlich die Vorstufen des Thrombins verstehen, und daß sich dieser Begriff, wie aus dem folgenden hervorgehen wird, nicht ganz mit den von A. Schmidt u. a. darunter verstandenen, von diesen Autoren übrigens nicht näher charakterisierten Stoffen deckt. Die früher von uns gebrauchte Bezeichnung „Serozym“ (= Thrombogen), worunter wir die thrombinartigen, aber noch nicht mit CaCl_2 verbundenen Abbauprodukte verstanden, scheint entbehrlich. Ebenso die vielen Termini wie Cytosym, Thrombozym usw., die in der Gruppe der Aktivatoren aufgehen.

Wir möchten zunächst versuchen, das Prothrombin näher zu charakterisieren. Viele Beobachtungen beweisen, daß der Vorrat, den eine Blutprobe oder ein Plasma an diesen Stoffen enthält, kein unbegrenzter ist, sondern früher oder später erschöpft wird. In Mitteilung II wurde gezeigt, daß je nach der Art, wie die Gerinnung verläuft, das aus einem gegebenen Plasma entstehende Serum zu neuerlicher Thrombinbildung bald mehr, bald weniger befähigt ist. Findet die Gerinnung auf eine Weise statt, daß hierbei eine starke Proteolyse erfolgt, so werden fast alle prothrombinartigen Stoffe in Thrombin übergeführt, das erhaltene Serum weist daher einen relativ großen Überschuß unverbrauchten Thrombins auf. Dieser geht bald in eine unwirksame Form über (s. u.), und wenn wir nunmehr versuchen, neuerlich Thrombin in diesem Serum entstehen zu lassen (Verdünnung bei Zusatz von CaCl_2 und Aktivatoren), so gelingt dies nur in sehr geringem Grade; wohingegen eine Probe desselben Blutes, das unter Vermeidung aller die Proteolyse steigernden Einwirkungen (speziell nach Entfernung der Zellen und Blut-

plättchen) geronnen ist, ein zunächst thrombinarmes Serum liefert, das aber auf neue proteolytische Einflüsse hin mit reichlicher Neubildung von Thrombin antwortet. Im ersten Falle wurde somit fast alles Prothrombin aufgebraucht, im zweiten blieb davon noch ziemlich viel erhalten.

Weiter muß darauf hingewiesen werden, daß unter Prothrombin nicht etwa ein bestimmter Eiweißkörper oder eine einzige Vorstufe des Thrombins vorgestellt werden kann, sondern daß eine ganze Stufenleiter höherer Abbauprodukte als „Prothrombin“ angenommen werden muß. Von diesen stehen die einen dem Thrombin viel näher als die anderen, gehen daher auch leichter in dasselbe über, d. h. schon eine schwache Proteolyse wird sie auf die wirksame Thrombinstufe abbauen, während die höheren (z. B. albumosenartigen) Vorstufen erst durch stärkere hydrolytische Einflüsse so weit aufgespalten werden, daß sie bei Anwesenheit von CaCl_2 Thrombin ergeben. Wir müssen somit unter Prothrombin eine Vielheit mehr oder weniger hoch synthetisierter Abbauprodukte verstehen, die von einem, vielleicht auch von verschiedenen, nicht näher bekannten Eiweißkörpern abzuleiten sind.

Die Annahme verschieden leicht in Thrombin überführbarer Vorstufen liefert uns das Verständnis für eine ebenfalls schon früher mitgeteilte Beobachtung (Mitteilung II, S. 177), wonach gewisse Stoffe nur im Blut oder in noch ungeronnenem („metastabilem“) Plasma gerinnungsbeschleunigend wirken, während sie in prothrombinhaltigen Seren fast ohne Einfluß auf die Thrombinbildung sind. Dies gilt z. B. von der Wirkung adsorbierender Flächen oder Pulver („thromboplastische Substanzen“), die bei der Neubildung von Thrombin aus Serum kaum noch fördernd einzugreifen vermögen, während sie die Gerinnung von Blut deutlich beschleunigen.

Die Erklärung liegt darin, daß sie die Proteolyse nur in geringem Maße beeinflussen; sie sind daher nur dort wirksam, wo leicht in Thrombin überführbares Prothrombin vorhanden ist. Gerade dieses wird aber bei der spontanen Gerinnung zuerst verbraucht, dasjenige Prothrombin, das ein Serum nach seiner Gerinnung noch enthalten kann, bedarf dagegen viel

stärkerer Agenzien (chemischer Aktivatoren wie Abbauprodukte, Lipoidemulsion usw.), um Thrombin zu liefern¹⁾.

Es erhebt sich nunmehr die Frage, woher das Prothrombin des Blutes stammt. Es war naheliegend, anzunehmen, daß im Blutplasma ein bestimmter Eiweißkörper vorkommen dürfte, dessen Abbauprodukte das Prothrombin vorstellen. Dagegen spricht aber eine Reihe von Tatsachen. Zunächst sehen wir, daß es nicht mehr gelingt, ein Serum, dessen Prothrombingehalt bei der Gerinnung aufgebraucht wurde, dadurch wieder zu neuer Thrombinbildung zu befähigen (d. h. wieder prothrombinhaltig zu machen), daß man es einer mäßigen Hydrolyse unterwirft (z. B. Stehen in Verdünnung mit NaHCO_3 -Lösung bei 37°). Hierbei würde ein Prothrombin-Eiweißkörper zweifellos wenigstens zum Teil in Prothrombin-Abbauprodukte aufgespalten werden. Das gleiche gilt für Seren, die durch Inaktivierung (Erhitzung auf 56°) ihres Prothrombins zum größten Teil beraubt wurden. Geringe Mengen Prothrombin bleiben zwar relativ lange erhalten, selbst auf 56 bis 58° erhitzte Seren geben häufig noch eine schwache Thrombinbildung. (Wir führen diese Inaktivierung gleich jener des Thrombins, des „Komplementes“ und anderer „thermolabiler“ Serumbestandteile auf eine durch die Hitze bedingte Aufspaltung in tiefere unwirksame Komponenten zurück.) Wird nun ein derart prothrombinarm gemachtes Serum hydrolytischen Einwirkungen unterworfen (Stehen mit Bicarbonatlösung, Aufspalten mit Lauge usw.), so findet darin keine Neubildung von Prothrombin statt, d. h. solche Sera bleiben dauernd zu neuer Thrombinbildung unfähig. Daraus muß geschlossen werden, daß ein durch Aufspaltung in Prothrombin überführbarer Eiweißkörper im Blutplasma fehlt; es ist wahrscheinlich, daß das Stammeiweiß des Prothrombins sich in gewissen Zellen vorfindet und entweder nur in Form von Abbauprodukten ins Blut gelangt oder im Blute leicht zu Prothrombin (verschiedener Stufe) abgebaut wird.

¹⁾ Auf einen Mangel an leicht aufspaltbarem Prothrombin haben wir die bekannte schlechte Gerinnbarkeit des Blutes bei Hämophilie zurückgeführt (Zeitschr. f. klin. Med. 85, 1917).

Protokoll 1. Versuche über Restitution des Prothrombins.

A. Nach Erschöpfung bei der Gerinnung.

Serum aus spontan geronnenem Rinderblut bleibt 2 Tage stehen; dann wird eine Probe (a) weiter im Kühlraum gehalten, eine zweite (b) steht 8 Stunden bei 37°, nachdem sie mit dem 4fachen Volumen Na-Bicarbonatlösung (0,4%) versetzt worden. Beide Proben werden hierauf auf Thrombin- und Prothrombingehalt untersucht.

Zusätze wie aus der Tabelle ersichtlich, außerdem je 1,0 Fibrinogenlösung (Volumen je 2,0).

Zusatz	Serum a (je 0,1)	Serum b (je 0,5)
Allein	120'	fl.
2 Tr. CaCl ₂ -Lösung	90'	Gerinnsel 12 Std
2 Tr. CaCl ₂ + 1 Tr. Lipoidemulsion .	90'	Gerinnsel 18 Std

Serum a zeigt somit nur noch Spuren von Prothrombin außer einem schwachen Thrombingehalt. Durch Stehen bei 37° in schwach alkalischer Lösung wurden diese Reste noch weiter vermindert.

B. Nach Zerstörung durch Erhitzen.

1. Je 0,5 ccm Hammelserum aus Oxalatplasma werden mit 2,0 physiol. NaCl-Lösung verdünnt und mit etwas Toluol überschichtet. Eine Probe bleibt bei 0°, eine zweite steht 2 Tage lang bei 37°. Dasselbe geschieht mit zwei Proben desselben Serums, die durch 45 Min. auf 57° erhitzt worden waren. Bestimmung des Gehalts an Prothrombin und Thrombin wie oben unter A.

Zusatz	Serum aktiv		Serum inaktiv (57°)	
	0°	37°	0°	37°
Allein	M. ±	fl.	fl.	fl.
CaCl ₂	10'	45'	M.	M.
CaCl ₂ + Nierenextrakt .	1'	1 1/2'	50'	90'

M. = Gerinnung der Fibrinogenlösung am nächsten Morgen (ca. 16 Std.)

fl. = flüssig geblieben.

Auch hier hat die schwach hydrolytische Beeinflussung nur eine Abschwächung und kein Neuaufreten von Prothrombin zur Folge gehabt.

2. Hammelserum wird unter Essigsäurezusatz durch Kochen koaguliert, der Niederschlag gewaschen und in 0,5%iger Na-Bicarbonatlösung aufgeschwemmt. Die trübe Emulsion bleibt 4 Tage unter Toluol bei 37° stehen. Hierauf wird sie direkt sowie nach 15 Min. langer Behandlung mit $\frac{1}{10}$ -Lauge und folgender Neutralisierung auf Prothrombin geprüft. Das Ergebnis war gleichfalls negativ, ebenso nach 10 Tage langer Autolyse des koagulierten Eiweißes.

Es gelingt somit weder durch schwache noch durch kräftige hydrolytische Einwirkungen, das verloren gegangene Prothrombin durch frisch gebildetes zu ersetzen.

Man neigte früher zu der Annahme, daß die im Blutplasma gelösten Eiweißkörper von bestimmten Zellen abgegeben (sezerniert!) werden. Da aber Eiweißkörper durch noch funktionstüchtige Membranen nicht passieren können, scheint es uns wahrscheinlicher, daß alle Eiweißkörper des Blutes durch Zerfall von Zellen (namentlich derjenigen des Blutes und der „blutbildenden“ Organe) entstehen. Während z. B. von französischen Autoren die Produktion des Fibrinogens den Leberzellen zugeschrieben wurde, halten wir die für diese Hypothese erbrachten Beweise (Fehlen des Fibrinogens bei schwerer Schädigung der Leberfunktion usw.) für unzureichend und möchten uns der Ansicht von Morawitz und Rehn¹⁾, P. Th. Müller²⁾ u. a. anschließen, welche die Zellen der myeloiden Gewebe mit der Fibrinogenbildung in Zusammenhang brachten und Beobachtungen mitteilten, daß das Fibrinogen des Blutes durch Zerfall dieser Zellen entsteht.

Wir haben nähere Untersuchungen darüber angestellt, welche Zellen als Quelle des Serozyms in Betracht kommen. Von Morawitz³⁾ ist die Vermutung ausgesprochen worden, daß die Blutplättchen die Bildungsstätten des „Thrombogens“ sein dürften. Wir geben weiter unten einige Protokolle wieder, die zeigen, daß in verschieden geformten Elementen des Blutes Stoffe vorkommen, die bei Anwesenheit von Ca fibrinogenfällende Abbauprodukte liefern. Wesentlich ist aber, daß diese Fähigkeit zur Thrombinbildung stets nur eine sehr geringfügige ist, die mit der Wirkung, die ein in seinem Prothrombingehalt noch nicht geschwächtes Blutplasma oder Serum entfaltet, auch nicht annähernd konkurrieren kann. Sowohl mit roten Blutkörperchen oder mit den Schatten (Stromata) derselben wie mit Blutplättchen oder mit Lymphocyten (aus blutfreien Lymphdrüsen) lassen sich Lösungen erhalten, die nach Zugabe von CaCl₂ Fibrinogen zur Gerinnung bringen. Während aber ein Tropfen prothrombinhaltigen (und dabei thrombinfreien) Serums dieselbe Fibrinogenlösung schon nach wenigen Minuten gerinnen macht, tritt dies mit den erwähnten Zellextrakten meist erst nach

¹⁾ Morawitz und Rehn, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol 58, 1908.

²⁾ P. Th. Müller, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6.

³⁾ Morawitz, Arch. f. klin. Med. 79.

Stunden ein. Zusatz der gewöhnlichen Aktivatoren erweist sich hierbei als nur noch wenig fördernd (s. Prot. 2), was verständlich ist, da die Lösungen bereits selbst abbauend wirkende Stoffe enthalten.

Eine so ausgesprochene Wirkung von Plättchenextrakten, wie sie Morawitz beobachtet hat, konnten wir in zahlreichen in dieser Richtung angestellten Versuchen nicht feststellen. Nach unseren Befunden kann keine der bisher näher untersuchten Zellarten als deutliche oder vorwiegende Quelle des Prothrombins angesehen werden; es scheint uns vorläufig wahrscheinlicher, daß die prothrombinartigen Stoffe aus verschiedenen Zellen stammen und vermutlich bei deren Zerfall ins Plasma gelangen.

Protokoll 2. Prüfung auf Prothrombingehalt verschiedener Zellextrakte.

Rinderblutkörperchen werden 4 mal gewaschen und in Wasser gelöst: I. Von einem Teil der Lösung werden die „Schatten“ abzentrifugiert, nochmals gewaschen und hierauf in NaCl-Lösung emulgiert; sie stehen hierauf über Nacht unter Toluol bei 37°: Lösung II. Das Hämoglobin (ohne Schatten) wird als Lösung III eingestellt. Fein zerriebene Rinderlymphdrüse, in NaCl-Lösung emulgiert, steht 20 Stunden unter Toluol bei 37°; hiervon der klarere obere Teil: IV. Rinderplättchen, aus Oxalatblut durch Zentrifugieren erhalten, 2 mal gewaschen (die dicke weiße Haut über der Erythrocytenschicht wird in viel physiol. NaCl-Lösung aufgeschwemmt und leicht geschüttelt), zuerst nur einige Minuten zentrifugiert, wodurch eine schön weiße, stark trübe Plättchenemulsion erhalten wird. Aus dieser werden die Plättchen durch scharfes Zentrifugieren am Boden des Röhrchens als eine Art Membran erhalten, aus der sie sich nur noch teilweise wieder trennen und emulgieren lassen. Die Membran wird daher nur mäßig in frischer NaCl-Lösung geschüttelt und nochmals zentrifugiert. Der Bodensatz wird in Wasser gelöst und bleibt über Nacht bei 37° unter Toluol. Die Plättchen lösen sich darin vollständig auf: Lösung V. Dasselbe mit Hammelplättchen: VI. Hammeloxalatserum, je 1 Tropfen: VII. Fibrinogen allein: (Kontrolle). Von den Lösungen I bis VI wurden Mengen von 0,3 bis 0,4 verwendet und wie immer mit Kalk sowie mit einem Lipoidextrakt geprüft. Reihe 4 zeigt die Kombination von Lymphdrüsenextrakt (Lösung IV) mit den anderen Extrakten nach Art eines Aktivators eingestellt. Nachdem die Mischungen (Volumen je 1,5 ccm) 15 Min. gestanden, wird 1,0 Fibrinogenlösung zugesetzt.

Zusatz	Lösung Nr.							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	K.
Allein	fl.	fl.	fl.	fl.	fl.	fl.	3 Std.	fl.
+ CaCl ₂	6 Std.	6 Std.	M.	5 Std.	6 Std. flockig	2 Std. zart ge- ronnen	15'	6 Std. Ge- rinnsel
+ CaCl ₂ + Lipoid	6 "	6 "	6 Std.	5 "	6 Std. netzlig	4 Std. zart ge- ronnen	1	6 Std. Ge- rinnsel
+ CaCl ₂ + Lymph- drüsenextrakt .	4 "	5 "	6 "	4 ¹ / ₂ "	90'	90'	1	6 Std. netzlig

Der Versuch zeigt: Thrombin war in den untersuchten Extrakten nicht vorhanden (oberste Reihe; nur im Serum VII Spuren). Mit CaCl₂ versetzt ergeben dagegen alle Extrakte eine zwar langsame, aber deutliche Gerinnung des Fibrinogens. Während die Kontrolle (2mal umgefälltes Rinderfibrinogen) allein mit Kalk nach 6 Stunden nur einige Flöckchen aufwies (Gerinnsel), waren die Röhrchen I, II, IV und VI nach dieser Zeit (zum Teil schon früher) geronnen. Nur Hämoglobin (III) gerann erst über Nacht. Die Zugabe von Lipoidemulsion (Merckscher Herzextrakt), der die Thrombinbildung im Serum (VII) stark anregte, war fast durchgehend ohne Wirkung. Hingegen ergab die Kombination mit Lymphdrüsenextrakt IV (je 1 Tropfen) eine gewisse Beschleunigung, die namentlich mit den beiden Plättchenextrakten auffallend war, da hier die Gerinnung schon nach 90 Min. eintrat. Welcher Stoff hierbei die Rolle des Prothrombins, und welcher diejenige des „Aktivators“ gespielt hat, ließ sich nicht leicht entscheiden. Bei derartigen Versuchsanordnungen ergibt sich eben, daß die Grenze zwischen Prothrombin und Aktivator nicht immer scharf ist, so daß bloß von einem Auftreten oder Vorkommen fibrinogenfällender Abbauprodukte gesprochen werden kann. Es ist nach dem Vorhergehenden verständlich, daß manche Abbauprodukte aus Zellen usw., sobald sie Kalksalzbindungen eingegangen sind, Fibrinogen ausfällen, also Thrombin-(oder Prothrombin-)charakter haben, während sie gleichzeitig den Abbau vorhandenen Prothrombins befördern, somit als Aktivatoren („Cytozyme“) funktionieren können.

Im Vergleich zu dem in der Dose von bloß 1 Tropfen verwendeten Hammelserum war jedenfalls in keinem der geprüften Zellextrakte ein größerer Prothrombingehalt nachweisbar.

Protokoll 3.

Blutplättchen, nach der oben angegebenen Weise gewonnen und meist in Wasser 12 Std. lang bei niedriger Temperatur extrahiert; von der Lösung wurden 0,2 bis 0,5 zu 1,5 Fibrinogenlösung, die 2 Tropfen CaCl₂ erhalten hatte, zugesetzt. In der folgenden Tabelle sind die Gerinnungszeiten von verschiedenen Versuchen vereinigt. Als Kontrolle Fibrinogen mit CaCl₂ ohne Plättchen.

Tierart	Plättchenextrakt		Kontrolle
	frisch	gekocht	
Ziege	100' netzig	7 Std. netzig	24 Std. Gerinnsel
Mensch a) . .	M. netzig	M. flockig-netzig	M. flockig
" b)	M. fest	M. fest	M. flockig
Hammel a) . .	2 $\frac{1}{2}$ Std. fest	—	M. Gerinnsel
" b)	3 $\frac{1}{2}$ Std. fest	7 Std. netzig	7 Std. netzig
Rind	3 Std. Flocken, später netzig	6 Std. flockig-netzig	6 Std. Gerinnsel

M = Gerinnungsbefund am nächsten Morgen.

Es ergeben sich somit meist deutliche, aber recht geringfügige Wirkungen, die nach Erhitzen der Plättchenextrakte abgeschwächt sind.

Was die Natur der Aktivatoren anbelangt, so haben wir schon in unserer früheren Mitteilung auf die große Verschiedenheit der hier in Betracht kommenden Stoffe hingewiesen, aber dennoch die Ansicht ausgesprochen, daß allen eine ähnliche Wirkungsweise (nämlich Steigerung der Abbauvorgänge) zugrunde liegen dürfte. Wir hätten in dieser Hinsicht nichts Neues hinzuzufügen, wenn nicht eine vor kurzem an dieser Stelle erschienene Arbeit von Stuber und Heim uns nötigte, die von diesen Autoren erhobenen Befunde und namentlich die gegebene Deutung derselben kritisch zu betrachten.

Diese Autoren haben gefunden¹⁾, daß Zusatz von Emulsionen von Neutralfetten oder höheren Fettsäuren die Gerinnung rekalkifizierten Oxalatplasmas beschleunigt, und glauben daraus den Schluß ziehen zu können, daß den Fettsäuren bei der Gerinnung in vivo eine wichtige Rolle zukomme. In einer früheren Mitteilung hatten sie das Thrombin sogar einfach mit gewissen Ca-Seifen identifiziert. Sie sind der Ansicht, daß die aktivierende Wirkung der Organextrakte eine Folge ihres Lipase- und Fettgehaltes sei, und daß Körper dieser Gruppe für die Gerinnung unerlässlich wären. Sie führen zwar den Einfluß von Fettsäuren bei der Gerinnung auf eine spezifische Anionwirkung zurück, bestreiten aber doch die Richtigkeit unserer Angabe, daß Säuren die Thrombinbildung beeinträchtigen.

Wir heben aus den Protokollen dieser Autoren folgende Befunde hervor: Zusatz von schwach sauren Emulsionen von

¹⁾ Diese Zeitschr. 77, 333.

Triglyceriden höherer Fettsäuren beschleunigen die Gerinnung von rekalkifiziertem Oxalatplasma. Emulsionen von Tierkohle sowie bloße Gummilösung, wie sie von Stuber und Heim zur Stabilisierung ihrer Fettemulsionen verwendet wurden, wirken gleichfalls sehr deutlich beschleunigend (z. B. Triolein 6 Min., Gummilösung $6\frac{1}{2}$ Min., NaCl-Kontrolle $20\frac{1}{3}$ Min. in Tabelle I; Tripalmitin $2\frac{1}{2}$ Min., Triolein $10\frac{1}{2}$ Min., Tierkohle $3\frac{1}{2}$ Min. in Tabelle VII usw.). Diese Befunde erhärten somit nur die bekannte Tatsache, daß viele Emulsionen (namentlich solche mit gut adsorbierenden Oberflächen) die Thrombinbildung verstärken. („Thromboplastische Wirkungen.“) Wir haben schon vor mehreren Jahren auf die gute Wirkung von ölsaurem Na aufmerksam gemacht¹⁾ und sehen in den Versuchen von Stuber und Heim eine Bestätigung unserer damaligen Versuche.

Werden an Stelle von Neutralfetten Fettsäuren verwendet, so begünstigen nur geringe Mengen derselben die Gerinnung. Ein bestimmter Zusatz erweist sich als optimal, ein Mehr hemmt bereits. Je stärker dissoziiert die Säure ist, desto weniger darf zugesetzt werden. Am besten wirken ganz schwache Säuren, wie die höheren Fettsäuren. Auch wir haben in unserem, der Frage der optimalen Reaktion gewidmeten Protokoll angegeben, daß sehr schwache Säuren, wie Borsäure, die Thrombinbildung fördern. Von allen stärkeren Säuren haben wir dagegen nur eine Hemmung gesehen. Wie ist dieser Widerspruch zwischen den erwähnten Autoren und uns zu erklären? Bei unseren Versuchen wurde die Thrombinbildung in einem Milieu vorgenommen, das außer einigen Tropfen prothrombinhaltigen Serums kein Eiweiß enthielt; hinterher wurde das gebildete Thrombin mit Fibrinogenlösung gemessen. Stuber und Heim lassen dagegen die Thrombinbildung in jeweils 2 ccm Oxalatplasma stattfinden. Während wir somit (absichtlich) ein eiweißarmes, für geringste Säuremengen daher sehr empfindliches Milieu hatten, verwenden die Autoren eine Lösung, die infolge ihres hohen Eiweißgehaltes und ihrer bicarbonat-alkalischen Reaktion eine relativ große Menge von Säure binden kann, bis der Neutralitätspunkt erreicht wird. Durch den

¹⁾ Diese Zeitschr. 68, 163.

Säurezusatz erreichen sie somit, daß sich die Reaktion der nach unseren Befunden optimalen Zone (nahe der neutralen, noch eben etwas alkalischen Reaktion) nähert, und erzielen so eine bessere Thrombinbildung (siehe auch unter Protokoll 5). Diese Befunde sind somit keineswegs im Gegensatz zu unseren Angaben¹⁾, sondern auf Grund derselben gut verständlich. Eine besondere Aktivität der höheren Fettsäuren anzunehmen, ist nach den Protokollen Stubers und Heims nicht notwendig. Denn die Säuren wirken ganz allgemein um so besser, je schwächer dissoziiert sie sind; bei den Fettsäuren kommt noch dazu, daß ein geringer Überschuß derselben nicht schaden kann, weil ein solcher beim Rekalzifizieren durch das CaCl_2 als unlösliche Ca-Seife ausfällt und dadurch für die Gerinnung eliminiert wird (höchstens dank seiner Oberfläche „thromboplastisch“ wirken könnte).

Die aktivierende Wirkung von Lipasen, über die St. und H. berichten, möchten wir auf das Eiweißabbauvermögen solcher chemisch ja recht komplizierten Lösungen zurückführen, wie wir auch die Ansicht ausgesprochen haben, daß die verschiedenen Organextrakte durch die an den Oberflächen von Lipoiden adsorbierten Abbauprodukte (und nicht durch ihren Fett- und Lipasegehalt) auf die Thrombinbildung einwirken.

Protokoll 4.

Ölsäure (Kahlbaum) wird 1% in Alkohol gelöst. Ebenso Na-Oleat $\frac{1}{2}$ %. Von beiden Lösungen wird durch Einspritzen in physiol. NaCl-Lösung eine 1%ige Emulsion hergestellt. Man erhält auf diese Weise leicht sehr feine und gleichmäßige Emulsionen, die auch ohne Gummizusatz längere Zeit stabil bleiben; hiervon wird die angegebene Menge zu je 1,0 Rinderoxalatplasma zugesetzt und dieses hierauf mit 3 Tropfen 1%iger CaCl_2 -Lösung rekalzifiziert.

¹⁾ Der Einwand Stubers und Heims, daß in unseren Versuchen das CaCl_2 durch die Säure (wir haben unter anderem HCl und $\text{CH}_3\text{-COOH}$ verwendet!) gebunden worden wäre, ist uns unverständlich; ebenso müssen wir die Bedenken gegen eine „ganz allgemeine Übertragung unserer Resultate auf den Gerinnungsvorgang in vivo“, welche die Autoren nur damit begründen, „daß im Organismus ganz andere Ausgleichsmöglichkeiten gegeben sind“, als nicht gerechtfertigt empfinden.

		Menge des Zusatzes				
		1,5	1,0	0,5	0,2	0,0
Ölsäure 1 ⁰ / ₁₀₀	Reaktion (Lackmus)	Neutral, Spur sauer?	Neutral	Schwach alkal.	Schwach alkal.	Schwach alkal.
do.	Gerinnungszeit	9 ¹ / ₂ '	7'	8'	12'	12'
Ölseife (Na) ¹ / ₂ ⁰ / ₁₀₀	do.	—	—	6'	7'	—
Alkohol 10 ⁰ / ₁₀₀ in physiol. NaCl	do.	—	10'	11'	—	13'

Optimale Wirkung der Ölsäure bei neutraler Reaktion. Ölseife wirkt etwas besser als Ölsäure.

Da das Fibrinogen durch Adsorption gewisser Ca-Salzverbindungen ausfällt, war daran zu denken, ob nicht gewisse Kalkseifen (namentlich wenn sie bei Gegenwart von Fibrinogen ausgefällt werden, so daß für Adsorption besonders günstige Bedingungen bestehen) thrombinartig wirken würden. Wir haben schon in unserer Ölseifenarbeit die diesbezüglichen Kontrollen gemacht und sind zu negativen Resultaten gekommen. Inzwischen haben Stuber und Heim angegeben, daß sie in reinen Fibrinogenlösungen durch „Fettsubstanzen“ typische Gerinnungen bekommen hätten. Wir haben deshalb noch weitere Versuche in dieser Richtung angestellt, aber auch diesmal mit durchgehend negativen Ergebnissen. Wir glauben daher behaupten zu dürfen, daß die Ca-Seifen der höheren Fettsäuren gewiß nicht das Thrombin sind oder ersetzen können.

Es wurden von Ölsäure, ölsäurem, palmitin-, stearin- und elaidinsäurem Na ¹/₂⁰/₁₀₀ Lösungen in Alkohol hergestellt und davon Emulsionen in Wasser und in CaCl₂-haltigem Wasser gemacht und mit Fibrinogenlösungen mit und ohne CaCl₂-Zusatz geprüft. Wir haben auch in Fibrinogenlösungen (mit und ohne CaCl₂-Gehalt) die alkoholische Lösung der Fettsäure oder Fettseife direkt eingespritzt und so die Trübung und Fällung bei Gegenwart des Fibrinogens stattfinden lassen. Alle Versuche blieben negativ (palmitin- und stearinsäures Na geben in phys. NaCl-Lösung auch ohne Fibrinogen flockige Fällungen, die etwas an Fibrinflockungen erinnern.)

Die hauptsächlichste Stütze, die für die Annahme einer lipoiden Natur der „Cytosyme“ vorgebracht wurde, sind die Befunde von Bordet und Delange, Zak u. a., wonach mit

Petroläther lipoidfrei gemachtes Plasma nicht mehr gerinnt, nach Restitution der Lipide aber sein Gerinnungsvermögen wieder erlangt. Wir haben diese Tatsache, welche auch von Stuber und Partsch herangezogen wurde, um die große Bedeutung der Lipide und Fettsäuren für die Gerinnung zu beweisen, einer Nachprüfung unterzogen und kommen hierbei zu folgenden Ergebnissen:

Wenn man zellfreies Oxalatplasma durch mehrere Tage mit Petroläther wiederholt kräftig schüttelt, so erhält man wohl eine deutliche Abschwächung seines Gerinnungsvermögens, d. h. nach Rekalzifizieren gerinnt ein solches Plasma viel langsamer als vor seiner Behandlung. Läßt man eine 2. Probe desselben Plasmas während derselben Zeit bei niederer Temperatur (2 bis 3°) stehen, so ergibt sich ebenfalls eine bald mehr, bald weniger starke Abnahme seiner Gerinnbarkeit. Es tritt hierbei ein geringfügiger Bodensatz von feinflockigen Globulinen auf. Vergleichen wir das im Kühlraum gestandene und das mit Petroläther extrahierte Plasma, so ergibt sich:

1. Beide werden, wie schon Zak festgestellt hat, durch Lipoidzusatz in ihrer Gerinnung beschleunigt. Die Lipide wirken somit (wie ja bekannt) in einem Plasma nicht nur dann aktivierend, wenn die natürlichen Lipide fehlen, sondern auch sonst bei andersartigen Hemmungen, bei denen eine Störung im Lipoidhaushalt des Plasmas nicht angenommen werden kann (bloßes Stehen). In unserm Fall ist die Verzögerung der Gerinnung wohl dadurch bedingt, daß durch Autolyse des Plasmas während des Stehens im Kühlraum die das Fibrinogen in Lösung haltenden Stoffe vermehrt wurden. Der Globulinbodensatz enthält zwar die Gerinnung fördernde Stoffe, die aber in einem vorher plättchenfrei zentrifugierten Plasma meist nicht sehr aktiv sind. Jedenfalls kann nicht angenommen werden, daß durch Ausfallen dieses wenig voluminösen Niederschlages das darüber stehende Plasma frei oder auch nur wesentlich ärmer an Lipoiden geworden sei.

2. Wenn man zu beiden Plasmen einen sicher lipoidfreien Aktivator zusetzt, so gerinnen sie prompt wie bei Zusatz von Lipoiden; woraus in eindeutiger Weise hervorgeht, daß nicht notwendigerweise Lipide, sondern

überhaupt ein kräftig abbauender Faktor nötig war, um die Gerinnung schneller ablaufen zu machen.

Aus dieser Feststellung folgt, daß die Gerinnung auch ganz ohne Lipide vor sich gehen kann und daß somit den Lipiden für die Thrombinbildung keine spezifische, durch andere Stoffe nicht ersetzbare Rolle zukommt, wie dies von Zak, Stuber u. a. angenommen wurde. Auf Grund der in unseren vorhergehenden Mitteilungen angestellten Erwägungen sind wir vielmehr der Ansicht, daß umgekehrt der Gehalt an adsorbierten, proteolytisch wirkenden Eiweißabbauprodukten es ist, der vielen Lecithin- und anderen Lipidemulsionen ihre Gerinnungsaktivität verleiht. Doch möchten wir die Frage noch offen lassen, ob diese die Proteolyse steigernden Stoffe nur den Eiweißabbauprodukten angehören, und ob nicht auch, wie es wahrscheinlich ist, Lipoidspaltprodukte die Hydrolyse von Eiweißkörpern und deren Derivaten befördern können; diesbezügliche Untersuchungen sollen Gegenstand einer späteren Mitteilung sein.

Protokoll 5.

Rinder- und Hammeloxalatplasma (vollständig zellfrei) werden teils im Kühlraum (2 bis 3°) aufbewahrt, teils im Scheidetrichter durch eine Woche hindurch täglich wiederholt mit Petroläther kräftig durchgeschüttelt. Gleichzeitig wird eine lipoidfreie Aktivatorlösung auf folgende Weise hergestellt: Aus einem wässrigen Lungenextrakt werden durch Essigsäure die Nucleoproteine ausgefällt und im Exsiccator auf Glas bei 37° getrocknet. Der sehr spröde Rückstand gibt in der Reibschale ein äußerst feines Pulver, das während mehrerer Tage mit Alkohol, schließlich mit Äther extrahiert und nach dem Verdunsten der Ätherreste in Wasser emulgiert wird; hierin geht es teilweise in Lösung. — Nach 7tägiger Behandlung beider Plasmen mit Petroläther wurde Versuch 1 angestellt, der Rest der Plasmen nochmals eine Woche wie vorher mit Petroläther extrahiert und neuerlich geprüft.

Die Tabelle zeigt die Gerinnungszeiten von je 1,0 Plasma, nachdem es mit je 3 Tropfen 1%iger CaCl_2 -Lösung sowie mit den angegebenen Zusätzen (jeweils 0,3) versetzt worden. Die Lipidemulsion war eine in gewöhnlicher Weise erhaltene Emulsion von Merckschem Herzextrakt 1:20 phys. NaCl.

	Art des Plasmas	Zusatz von je 0,3		
		phys. NaCl	Lipoid-Merck	Lungen-Nucleo-protein
Versuch 1	Rind, Kühlraum	90 +	15'	8'
	" Petroläther	50'	26'	7'
	Hammel, Kühlraum	26'	11'	5'
	" Petroläther	26'	12'	6'
Versuch 2	Rind, Kühlraum	4 Stdn.	30'	14'
	" Petroläther	6 Stdn.—beginn.	50'	16'
	Hammel, Kühlraum	90'	21'	17'
	" Petroläther	15'	26'	19'

Der gut wirksame lipoidfreie Lungenextrakt bewirkt somit rasche Gerinnung des mit Petroläther extrahierten wie des durch Autolyse schwer gerinnbar gewordenen Plasmas.

Wir möchten im folgenden noch auf die Rolle des Ca bei der Gerinnung etwas näher eingehen. Nach der von uns entwickelten Theorie der Gerinnung beruht die Thrombinbildung auf dem Abbau des Prothrombins und Umwandlung der entstehenden Abbauprodukte in CaCl_2 -Salzverbindungen. Das letztere kann nur bei Anwesenheit von Kalksalzen vor sich gehen, und wir verstehen daher, warum die Thrombinbildung im kalkfreien Medium ausbleibt. Wie aber steht es mit der ersten Phase, nämlich der Aufspaltung des Prothrombins in die Abbauprodukte von der Stufe des Thrombins? Vergleicht man durch quantitative Messung der mit Ninhydrin reagierenden Körper die Aufspaltung eines Serums im kalkhaltigen und im kalkfreien (Oxalat-)Medium, so findet man zwar gewisse Unterschiede, auf die wir hier nicht näher eingehen können; es läßt sich aber leicht feststellen, daß die Proteolyse (z. B. unter dem Einfluß eines Aktivators) durch das Fehlen des Ca nicht verhindert wird. Dennoch wird das Prothrombin, solange Kalk fehlt, auch durch kräftige Aktivatoren nicht wesentlich angegriffen, wie Protokoll 6 zeigt. Lassen wir ein prothrombinhaltiges Serum bei Anwesenheit von Kalk mit einem Aktivator stehen, so tritt in den nächsten Minuten eine sehr intensive Thrombinbildung ein; das entstehende Thrombin ist nach 1 bis 2 Stunden wieder zum größten Teil unwirksam geworden, worauf sich weder durch Kalk noch Aktivatorzusatz neues Thrombin in nennenswerter Menge hervorrufen läßt. Lassen wir das

Serum dagegen stundenlang mit demselben Aktivator stehen, nachdem wir ihm durch Oxalat oder Citrat seine dissoziierten Kalksalze genommen, so kann derselbe trotz seiner Fähigkeit, die Proteolyse zu steigern, dem Prothrombin nichts anhaben. Wenn wir nach dieser Zeit rekalkifizieren, setzt erst jetzt eine Umwandlung des Prothrombins in Thrombin ein, die ungefähr gleich schnell verläuft, wie wenn das betreffende Serum ohne Aktivator gestanden hätte.

Zur Erklärung dieser Tatsache könnte angenommen werden, daß das Prothrombin nur bei Gegenwart von Kalksalzen abbaufähig ist. Eine solche Hypothese scheint uns aber mit den bekannten Eigenschaften der Kalksalze, die eher zu Fällungen als zu Hydrolysen günstige Bedingungen zu schaffen pflegen, nicht gut vereinbar und auch sonst eiweiß-chemisch nicht genügend gestützt. Die folgende Auffassung dürfte in dieser Hinsicht besser befriedigen.

Im kalkhaltigen Medium gehen die durch Proteolyse des Prothrombins entstehenden Abbauprodukte dank ihrer großen Neigung, Ca-Salzbindungen einzugehen, sofort in Kalkverbindungen über. Wir nehmen an, daß sie als solche (vielleicht infolge einer Änderung ihrer Löslichkeit) besonders rasch an kolloidale Oberflächen adsorbiert werden. Die Abbauprodukte des Prothrombins verschwinden auf diese Weise schnell aus der eigentlichen Lösung, was zur Folge hat, daß weitere Abspaltung aus dem noch vorhandenen Prothrombin stattfinden kann. So wird fortwährend neues Thrombin gebildet und wieder adsorbiert, das Gleichgewicht zwischen Prothrombin und Thrombin wird daher erst erreicht, wenn sehr viel Thrombin entstanden, resp. fast alles Prothrombin verbraucht ist. Fehlen dagegen die Kalksalze, so findet durch den Aktivator zwar auch ein Abbau im Serum (oder Plasma) statt. Die entstehenden NaCl-Abbauprodukte sind hingegen nur schwer adsorbierbar, sie bleiben frei in der Lösung, es wird daher relativ bald ein Gleichgewicht erreicht und keine weitere Aufspaltung von Prothrombin stattfinden. Das Prothrombin bleibt daher erhalten, d. h. es wird nur entsprechend den übrigen Eiweißkörpern des Milieus abgebaut und als NaCl-Salzverbindung sich vorfinden, während in der Ca-haltigen Lösung durch die jeweilige Ausschaltung der mit Kalk reagierenden thrombin-

artigen Polypeptide eine geradezu elektive, weitere Aufspaltung des Prothrombins eintreten muß. So erklärt sich die plötzliche Entwicklung großer Thrombinmengen, die das vorhandene Prothrombin in kurzer Zeit vollständig aufbrauchen kann, während umgekehrt im kalkfreien Medium trotz Zusatz von Aktivator nur ein ganz unbedeutender Umsatz von Prothrombin erfolgt. Da die wenigen hierbei entstehenden Abbauprodukte als NaCl-Salzverbindungen sich vorfinden und nach dem Rekalzifizieren sich erst in CaCl₂-Verbindungen umsetzen müssen, ist verständlich, daß die Thrombinbildung in diesem Falle fast ebensoviel Zeit beansprucht, als wenn der Aktivator fast gleichzeitig mit dem CaCl₂ zugesetzt worden wäre. Kleine Unterschiede im Sinne einer etwas rascheren Thrombinproduktion finden sich übrigens doch meist, wie Protokoll 8 zeigt.

Wir sehen somit, daß das Thrombin in den stets eiweißhaltigen Lösungen, in welchen es entsteht, nicht frei bleibt, sondern rasch an kolloidale Oberflächen adsorbiert wird. Daher u. a. die Unmöglichkeit, Thrombin durch Dialyse von den Eiweißkörpern abzutrennen. Diese Adsorption dürfte aber, wofern sie an schon mit Abbauprodukten beladene Teilchen stattfindet, eine nur lockere sein; die Thrombinmoleküle verlieren dadurch zunächst nicht an ihrer Wirksamkeit, d. h. an ihrer Fähigkeit, Fibrinogen auszufällen. Sowie sich nämlich Fibrinogen in der betreffenden Lösung befindet, zieht dieses infolge einer weit höheren Adsorptionskraft¹⁾ das Thrombin an seine Oberflächen und wird dadurch seinerseits unlöslich. Ist nun das Thrombin schon an andere Oberflächen kolloidaler Teilchen adsorbiert, so wird es davon entweder wieder losgelöst oder die letzteren werden z. T. mit dem Thrombin an das Fibrinogen mitabsorbiert und fallen mit ihm aus. Das Fibrin enthält daher meist noch andere Serumeiweißkörper an seinen Oberflächen adsorbiert; dieselben können entweder beim Auspressen des Serums mitentfernt werden, oder sie bleiben am Fibrin haften und werden erst allmählich frei, wenn z. B. Fibrin in Wasser oder Salzlösung autolytisch wird. Hierbei werden diese Eiweißteilchen aufgespalten, sie verteilen sich

¹⁾ Worauf dieselbe beruht, soll in unserer nächsten Mitteilung zur Chemie der Eiweißkörper besprochen werden, die den Bluteiweißkörpern gewidmet ist.

kolloidal im Lösungsmittel, wobei sie das an ihnen adsorbiert gewesene Thrombin mitnehmen; dieses gelangt so in Freiheit (z. T. an Kolloidteilchen adsorbiert) und läßt sich in der Lösung nachweisen („Nolfsche Thrombinlösung“). Die Autolyse eines Koagulums geht um so schneller von statten, je mehr Abbauprodukte und fibrinfremde Eiweißkörper (Blutzellen, Serum-eiweiß) in ihm eingeschlossen waren, während Fibrin aus zellfreiem Oxalatplasma nur langsam durch Aufspaltung in teilweise Lösung übergeht.

Wenn wir eine Lösung, in der sich reichlich Thrombin entwickelt hat, stehen lassen, ohne ihr Fibrinogen zuzusetzen, so kommt es zu einer raschen Abschwächung der Thrombinwirkung derselben. Morawitz nahm daher den Übergang desselben in eine unwirksame Modifikation, das „Metathrombin“, an. Wir möchten diese Umwandlung darauf zurückführen, daß die mit Thrombin belegten Kolloidteilchen sich allmählich durch gegenseitige Adsorption aneinanderlegen und dadurch aus einer hochdispersen in eine niedriger disperse Phase übergehen; dies bedingt, daß sie ihre Fähigkeit, vom Fibrinogen adsorbiert zu werden, immer mehr verlieren. Daher kann nur noch ein kleiner Teil derselben thrombinartige Wirkung entfalten; spalten wir aber diese Komplexe wieder auf, so können wir dem Thrombin für kurze Zeit seine Aktivität wieder zurückgeben. Hierauf dürfte wohl die Reaktivierung alter Thrombinlösungen durch Alkali- oder Säureeinwirkung beruhen, ein Verfahren, durch das niedriger disperse Eiweißteilchen in höher disperse übergeführt werden. Wird die Aufspaltung hierbei zu weit getrieben, so wird das Thrombin selbst auch aufgespalten, weshalb die Einwirkung nur kurzdauernd sein darf. Das so befreite Thrombin hält sich nur kurze Zeit im Serum; es geht anscheinend durch weitere Hydrolyse zugrunde, da eine neuerliche Reaktivierung nicht oder nur in ganz untergeordnetem Grade möglich ist. — Das Schicksal des Thrombins ist somit durch die Serumkolloide wesentlich mitbestimmt, die dasselbe einerseits (durch Adsorption und Dispersitätsveränderungen) schützen, dadurch aber gleichzeitig verdecken, unwirksam machen, so daß es nur durch eine Art von Aufschließung wieder frei wird.

Daß das „Metathrombin“ tatsächlich von dem früher vorhandenen

Thrombin abzuleiten ist, geht aus folgenden zum Teil schon bekannten Tatsachen hervor: Die Menge des durch Laugenbehandlung auftretenden Thrombins ist der ursprünglich vorhandenen Thrombinmenge proportional: von zwei Seren liefert jenes bei der Reaktivierung mehr Thrombin, das auch ursprünglich reicher daran war. Beim Vergleich verschiedener Tierseren fällt hierbei namentlich der sehr große Reichtum des Pferdeserums an Thrombin auf (an welchen auch Morawitz seine diesbezüglichen Untersuchungen ausgeführt hat), im Vergleich zu welchen Seren von Mensch, Hammel, Kaninchen usw. viel weniger zur Reaktivierung geeignetes Thrombin besitzen. Das durch Laugenreaktivierung erhaltene Thrombin ist nicht neugebildet; denn läßt man die Lauge bei Kalkmangel einwirken, so wird ebensoviel Thrombin frei als im kalkhaltigen Milieu; auch wird Prothrombin schon durch ganz kurze Laugen- (oder Säure-)behandlung deutlich abgeschwächt, seine Umwandlung in Thrombin nie gefördert (eine Tatsache, die zeigt, daß nicht jede beliebige, sondern nur ganz bestimmte Arten der Hydrolyse für die Aufspaltung des Prothrombins geeignet sind).

Für die Reaktivierung von Seren dürfte nicht nur die tatsächlich gebildete Thrombinmenge von Bedeutung sein; wichtig ist vermutlich auch, ob das Thrombin (trotz eventueller Adsorption) nicht doch allmählich tiefer abgebaut wird, ferner wie sich die Serumkolloide, an welchen es adsorbiert ist, durch Lauge aufspalten lassen usw. Von Interesse ist diesbezüglich z. B., daß die bekannte „Schmidtsche Thrombinlösung“ (mit Alkohol gefälltes Rinderserum, nach Wiederauflösen des getrockneten Niederschlages erhalten) sich durch Laugenbehandlung nicht verstärken läßt.

Protokoll 7.

Haltbarkeit des Prothrombins bei Gegenwart von Aktivatoren im kalkhaltigen und kalkfreien Medium.

4 Stunden altes Hammelserum (aus Oxalatplasma) wird in der Dose von je 0,5 in 8 Röhrchen abgefüllt; hierzu kommt je 2,5 cm phys. NaCl-Lösung, ferner in Serie A (4 Röhrchen) je 0,3 einer guten Aktivatorlösung. (Wässriger Mäusenierenextrakt.) Serie B bleibt ohne Extrakt. Röhrchen 1 jeder Serie erhält Zusatz von 0,25 CaCl₂, Röhrchen 2 ebensoviel phys. NaCl-Lösung, Röhrchen 3 je 0,1 Na-Oxalatlösung (1%), Röhrchen 4 0,2 Na-Citratlösung (2%). Alle Röhrchen bleiben nach Umschütteln 18 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, worauf die Röhrchen 3 und 4 beider Serien je 0,1 CaCl₂-Lösung erhalten und alle 8 Lösungen auf Prothrombin- und Thrombingehalt untersucht werden. (Je 0,4 ccm Lösung + 0,6 NaCl-Lösung + 0 (oberste Reihe der Tabelle), oder + CaCl₂ (2 Tropfen, die Röhrchen 1 jeweils nur noch 1 Tropfen) (mittlere Reihe), oder + CaCl₂ + 1 Tropfen Lipidextrakt Merck (1/40) (unterste Reihe). Als Kontrolle wird eine entsprechende Menge desselben Serums, das während der 18 Stunden unverdünnt stehen geblieben war, eingestellt. Nach 15' Stehen wird je 1,0 Fibrinogen zugesetzt.

Zusatz	Serie A (mit Aktivator gestanden)				Serie B (ohne Aktivator gestanden)				Kontroll-Serum
	CaCl ₂	NaCl	Oxal.	Citrat	CaCl ₂	NaCl	Oxal.	Citrat	
0	30'	fl.	fl.	fl.	20'	fl.	fl.	fl.	fl.
CaCl ₂	20'	3'	1 1/2'	2 1/4'	11'	15'	22'	14'	14'
CaCl ₂ + Akti- vator	20'	3'	1'	2'	1'	1'	5 1/2'	2 1/2'	2 1/2'

Beobachtet 6 Stunden.

Das Kontrollserum zeigt normales Verhalten. In der mit Aktivator gestandene Serie A ist das Prothrombin im CaCl₂-haltigen Röhrchen ganz zugrunde gegangen (kein Unterschied, ob mit oder ohne Aktivator geprüft, 20'), doch findet sich noch etwas Thrombin (30'). Das mit Oxalat und Citrat gestandene Prothrombin blieb dagegen sehr gut erhalten (1' resp. 2'). Die entsprechenden Vergleichsröhrchen der Serie B zeigen dagegen gut erhaltenes Prothrombin bei Stehen mit CaCl₂. (Hier ist das Oxalatröhrchen relativ schlechter, vermutlich weil durch den ausfallenden Oxalalniederschlag etwas Prothrombin mitgerissen wurde.) Die Unterschiede zwischen A und B in der mittleren Reihe (Kalk ohne Aktivator) beruhen auf der Gegenwart des Aktivators, der in Serie A zu Beginn des Versuchs zugesetzt worden war. Auf weitere Einzelheiten des Protokolls kann der Kürze halber nicht eingegangen werden.

Der Versuch zeigt, daß das Thrombinbildungsvermögen des Serums nach Stehen mit Aktivator in CaCl₂-haltiger Lösung verloren gegangen, im Oxalat- oder Citratmedium aber erhalten ist.

Protokoll 8.

Je 0,2 Hammelserum (wie oben) + 0,2 phys. NaCl-Lösung mit folgenden Zusätzen:

- I. + 3 Tropfen Nierenextrakt (wie oben) + 0,25 CaCl₂
- II. + 3 " " " " + 0,1 Na-Oxalat
- III. + 3 " " " " + 0,2 Na-Citrat
- IV. + 0,1 Na-Oxalat
- V. + 0,2 Na-Citrat.

Nach 2 Stunden erhalten II—V je 0,35 CaCl₂, IV bis V außerdem noch 3 Tropfen Nierenextrakt. In I hatte sofort zu Beginn des Versuches eine reichliche Thrombinbildung eingesetzt (10' später Gerinnung von Fibrinogen mit 0,3 der Lösung in 50'), nach den 2 Stunden war aber das Thrombin bereits zum großen Teil unwirksam geworden (Gerinnung erst in 20'). Es wird nun die Schnelligkeit der Thrombinbildung in II und III mit jener in IV und V verglichen, indem 3, 5 und 8 Min. nach dem Kalkzusatz je 0,3 aus jedem Röhrchen entnommen und in bereitgestellte Röhrchen mit Fibrinogenlösung (1,7 ccm) gebracht wird. Es ergeben sich folgende Gerinnungszeiten:

	Entnahme nach		
	3'	5'	8'
II (Oxal)	3'	1 $\frac{1}{2}$ '	1'
IV "	5 $\frac{1}{2}$ '	2 $\frac{1}{4}$ '	1 $\frac{1}{2}$ '
III (Citrat)	12'	3'	1 $\frac{1}{2}$ '
IV "	12'	5'	2'

Die Thrombinbildung ging somit in den Röhrcchen, in welchen das Prothrombin mit dem Aktivator gestanden, etwas schneller vor sich als dort, wo der Aktivator erst mit dem CaCl_2 zugesetzt wurde. Doch zeigt sich, daß gleichwohl eine gewisse Zeit bis zum Auftreten von Thrombin notwendig war, daß somit im wesentlichen der Prothrombinabbau erst nach dem Kalkzusatz einsetzte.

Zusammenfassung:

1. Die Arbeit enthält Vorschläge für eine einfache und einheitliche Nomenklatur der Gerinnungschemie. Sie geht ferner auf die Frage nach dem Wesen des Prothrombins und seiner Umwandlung in Thrombin näher ein, speziell auf die Rolle der Kalksalze.

2. Das Prothrombin kann nicht aus einem bestimmten Eiweißkörper des Blutes, noch aus einer bestimmten Art von Blutzellen abgeleitet werden. Vermutlich stammt es aus verschiedenen Zellen, durch deren Zerfall es in Form höherer Eiweißabbauprodukte ins Plasma gelangt.

3. Lipotide sind für die Gerinnung keineswegs unerlässlich. Ihre Rolle bei der Thrombinbildung deckt sich mit jener der übrigen Aktivatoren (Steigerung der Proteolyse). Ebenso ist die Annahme eines spezifischen Einflusses der höheren Fettsäuren auf die Gerinnung unbegründet.

4. Die als „Metathrombin“ bekannte Umwandlung des Thrombins in eine unwirksame Form wird auf Adsorptionsvorgänge an Serumkolloide zurückgeführt.

Die physiologische Bedeutung des Kaliums in der Pflanze.

Erwiderung auf die Mitteilung Th. Weevers.

Von

Julius Stoklasa.

(Eingegangen am 19. April 1917.)

Th. Weevers hat sich bemüht, die von ihm aufgestellte Hypothese, daß das Kalium besonders bei dem Aufbau der Eiweißkörper beteiligt ist, glaubwürdig erscheinen zu lassen, und protestiert in seiner kürzlich in dieser Zeitschrift¹⁾ erschienenen Entgegnung gegen meine Anschauungen, die dahin gehen, daß dem Kalium-Ion bei der Synthese der Kohlenhydrate eine hochwichtige Funktion zugewiesen ist. Seine Behauptungen bewegen sich jedoch, wie ich hier zeigen werde, auf ganz falschen Grundlagen.

Weevers will gefunden haben, daß das Kalium hauptsächlich in den Vakuolen vorhanden ist und in den Chromatophoren fehlt, also nicht direkt am Assimilationsprozeß beteiligt sein kann. Wie aus seiner Entgegnung erhellt, sind ihm meine Arbeiten „Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Funktion des Kalis“²⁾, ferner „Über den Einfluß des Kalium-Ions auf die Entwicklung der Zuckerrübenpflanze“³⁾ gar nicht bekannt. Ebenso fremd scheint ihm mein im März 1916 im Verlage von Gustav Fischer, Jena, erschienenes Buch „Beitrag zur Kenntnis der Ernährung der Zuckerrübe. Physiologische

¹⁾ Th. Weevers, diese Zeitschr. 78, 5. u. 6. Heft, 1917. (Eingegangen am 24. November 1916.)

²⁾ Julius Stoklasa, Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Österreich 1908.

³⁾ Julius Stoklasa, Österr.-ung. Zeitschr. f. Zuckerindustrie u. Landwirtschaft des Zentralvereins f. d. Rübenzuckerindustrie Österreichs u. Ungarns, XLIV. Jahrg. 1915, 6. Heft.

Bedeutung des Kalium-Ions im Organismus der Zuckerrübe¹⁾ zu sein.

Ich gelangte mit meinen Mitarbeitern Matoušek und Senft auf Grund zahlreicher mikroskopischer Untersuchungen zu dem Resultate, daß die Palisadenzellen am kalireichsten sind und die Chloroplasten stets eine größere Menge von Kalium aufweisen, wie dies aus meinen 12 mikrographischen Tafeln in meinem Buche „Beiträge zur Kenntnis der Ernährung der Zuckerrübe. Physiologische Bedeutung des Kaliums im Organismus der Zuckerrübe“ ersichtlich ist. In der Blattspreite tritt das Kalium-Ion in großen Mengen in den subepidermalen Schichten auf. Das Palisadengewebe unmittelbar unter der oberen Epidermis ist am kaliumreichsten. Die chlorophyllhaltige Zelle, sowie das Chlorophyll enthalten stets neben Phosphor und Magnesium Kalium, worauf ich schon in meiner Arbeit „Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls“²⁾ hingewiesen habe.

Im Boden wird das Kalium-Ion vom Wurzelsystem resorbiert und durch die peripheren Wurzelschichten, sowie durch das Gefäßbündelsystem, vornehmlich durch den Zentralbündelstrang in das Blatt geleitet, wo es dann die weitere Verteilung in dem Mesophyll erfährt. Das überaus reichliche Vorkommen von Kalium-Ion in den grünen Zellen, in denen es sich in der Umgebung der Chloroplasten hauptsächlich in den subepidermalen Zellschichten befindet, spricht für die Annahme, daß das Kalium-Ion bei dem Auf- und Abbau der Kohlenhydrate beteiligt und die Wirkung des Kalium-Ions am nächsten als eine katalytische zu erklären ist.

Unsere Wasserkulturen haben gezeigt, daß bei Abwesenheit des Kalium-Ions in der Nährlösung der im Samen vorhandene Vorrat an Kalium hauptsächlich in die beleuchteten Teile, meist in die Blattspreite wandert. Die Wurzel enthält verhältnismäßig weniger Kalium. Etiolierte Blätter fallen durch die geringe, in ihnen enthaltene Kaliummenge auf.

Nun schreite ich zur Widerlegung der anderen irrigen An-

¹⁾ Julius Stoklasa und Alois Matoušek unter Mitwirkung von Em. Senft, J. Šebor und W. Zdobnický. *Jena 1916.*

²⁾ Julius Stoklasa, Johann Šebor und Emanuel Senft, *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* 30, Abt. I, Heft 2, 1913.

sichten Weevers. Weevers behauptet in seiner Erwiderung, daß die Zuckerrübensamen ziemlich viel Kalium enthalten, und das Gewicht der Samen meistens 10—50 mg und der Kaliumgehalt $\pm 1,2\%$ beträgt (!)

Man kann überhaupt physiologische Ernährungsprobleme bei der Zuckerrübe nicht lösen, wenn man Rübenknäuel nicht von den Rübensamen zu unterscheiden? Das von ihm angegebene Gewicht bezieht sich doch auf Rübenknäuel und nicht auf Zuckerrübensamen, die in dem Rübenknäuel vorhanden sind. Ein kleiner Rübenknäuel weist ein Gewicht von ungefähr 10 mg, ein mittlerer ein solches von 25 mg auf, und nur höchst selten findet man ein Gewicht von 50 mg. Der Rübenknäuel ist ein physiologischer Ballast. Das Gewicht der Samen, in dem das erwachte Embryo die nötigen Reservestoffe für den Aufbau neuer Zellbausteine findet, beträgt durchschnittlich bloß 3—4 mg.

Ich habe schon im Jahre 1915 in meiner bereits zitierten Arbeit „Über den Einfluß des Kalium-Ions auf die Entwicklung der Zuckerrübenpflanze“ in der Zeitschrift für Zuckerindustrie, sowie in meinem Buche „Beitrag zur Kenntnis der Ernährung der Zuckerrübe“ darauf hingewiesen, daß die Trockensubstanz von 100 Stück Samen aus den Knäulchen ausgeschält 0,422 g wiegt, und in diesen befinden sich 0,00294 g Kaliumoxyd, also in einem Samen eine ganz minimale Menge. Wir haben die Entwicklung der Pflanzen in einem Nährmedium mit und ohne Kalium-Ion in verschiedenen Perioden ihrer Vegetation beobachtet, und die angewandte Methodik ist in obenerwähnten beiden Arbeiten genau beschrieben.

Der Vorwurf Weevers, daß ich die Bestimmung des Kaliums während der Entwicklung des Pflanzenorganismus vernachlässigt habe, ist ganz ungerechtfertigt, da ich ja die Ergebnisse meiner Versuche bezüglich Kaliumbestimmung in einem Nährmedium mit und ohne Kalium-Ion in den Pflanzen schon im Jahre 1915 und 1916 publiziert habe und sie in Anbetracht dessen nicht nochmals in meiner in dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit: „Ist das Kalium-Ion an der Eiweißsynthese in der Pflanzenzelle beteiligt?“¹⁾ wiederholen wollte.

¹⁾ Julius Stoklasa, diese Zeitschr. 73, 1. und 2. Heft, 1916.

Im folgenden gebe ich die Resultate unserer diesbezüglichen Beobachtungen wieder.

I. Periode: Zartestes Entwicklungsalter.

Die zu den Untersuchungen verwendeten, aus glasiertem Ton hergestellten Vegetationsgefäße wurden mit Sand und Torf gefüllt. Der Sand wurde zunächst mit konzentrierter kochender Salzsäure bis zur Abwesenheit jeder Spur von Kalium ausgewaschen, worauf ein Nachwaschen mit heißem und kaltem Wasser bis zum vollständigen Verschwinden der Chlorreaktion erfolgte. Dieselbe Prozedur wurde auch mit dem Torf vorgenommen. Der Torf wurde ebenfalls mit Chlorwasserstoffsäure längere Zeit digeriert und dann mit heißem Wasser so lange ausgewaschen, bis sich die Chlorreaktion nicht mehr nachweisen läßt. Hierauf wurde der Torf getrocknet und mit ausgewaschenem, ausgeglühtem und abgekühltem Sand gemischt. Es wurden 95% Sand und 5% Torf angewendet. In jedes Vegetationsgefäß wurden 15,5 kg Sand, gemischt mit Torf, gebracht.

100 Keimlinge wiesen ein Gewicht an Trockensubstanz von 0,238 g auf. An Kaliumoxyd waren 0,003 g vorhanden. Die schon weiter entwickelten Kulturen wurden mit einer Nährlösung begossen, woselbst alle Nährstoffe vertreten waren, während für eine andere Gruppe eine Nährlösung benützt wurde, in der das Kalium-Ion fehlte. Erwähnt sei hier auch, daß die Nährsalze umkrystallisiert und für kaliumfrei befunden wurden.

In der II. Periode nach 30 Vegetationstagen waren in dem Nährmedium mit allen Nährstoffen von 100 Pflanzen
in der Trockensubstanz der Blätter und Stiele . 4,70% K_2O
in der Trockensubstanz der Wurzeln 0,88 " "
vorhanden.

In 100 Pflanzen enthielten:
die Blätter und Stiele 0,408 g K_2O ,
die Wurzeln 0,014 " "
im ganzen daher 0,422 g K_2O .

Nährmedium ohne Kalium:
In der Trockensubstanz der Blätter und Stiele waren . . 0,47% K_2O ,
in der Trockensubstanz der Wurzeln 0,08 " "
konstatierbar.

Von 100 Pflanzen wiesen
die Blätter und Stiele . . 0,013 g K_2O ,
die Wurzeln 0,0008 " "
also zusammen 0,0138 g K_2O
auf.

In der III. Periode nach 60 Vegetationstagen.

Nährmedium mit allen Nährstoffen:
In der Trockensubstanz der Blätter und Stiele waren . . 4,64% K_2O ,
in der Trockensubstanz der Wurzeln 0,73 " "
zugegen.

Von 100 Zuckerrübenpflanzen enthielten somit	
die Blätter und Stiele . . .	143,051 g K_2O ,
die Wurzeln	7,190 „ „
daher zusammen	<u>150,241 g K_2O.</u>

Nährmedium ohne Kalium.

In der Trockensubstanz der Blätter und Stiele waren . . . 0,53% K_2O ,
in jener der Wurzeln 0,11 „ „
nachzuweisen.

Von 100 Zuckerrübenpflanzen enthielten daher	
die Blätter und Stiele . . .	0,0206 g K_2O
die Wurzeln	0,0018 „ „
zusammen daher	<u>0,0224 g K_2O.</u>

Wie wir also sehen, ist die junge Vegetation der Rübenpflanze, trotzdem das Nährmedium nach den jetzigen analytischen Methoden kaliumfrei war, imstande, die Spuren von Kalium-Ion, die sich nicht mehr analytisch nachweisen lassen, entweder aus den Nährsalzen oder aus dem ausgewaschenen Sand zu resorbieren. Aber diese Quantitäten sind so minimal, daß sie überhaupt nicht in Betracht kommen können.

Bei Abwesenheit von Kalium hatten die Rübenpflanzen ein sehr kümmerliches Aussehen, und die Blätter starben nach einer gewissen Vegetationsperiode immer ab.

Die neugebildeten grünen Blätter, die über die kleinen Quantitäten von Kalium, die von den abgestorbenen Blättern herrührten, verfügt haben, nahmen nach einer bestimmten Zeit eine rotbraune Farbe an und starben ab. Es bildeten sich wieder neue grüne Blätter, in denen sich kleine Mengen von Kalium-Ion mobilisierten, um wieder die nötige physiologische Lebensfunktion zu erfüllen. Die Pflanzen sind schon nach 60 Vegetationstagen vollständig zugrunde gegangen. Nicht unerwähnt lassen kann ich auch, daß sobald sich das Kalium-Ion im Nährmedium nicht befindet, das Wurzelsystem in der Entwicklung zurückbleibt, wodurch natürlich auf die ganze Resorption der Nährstoffe aus dem Boden ein höchst ungünstiger Einfluß ausgeübt wird. Die eklektive Resorption des Kalium-Ions aus dem angeblich kaliumfreien Nährstoffmedium genügte durchaus nicht zur Bildung neuer lebender Substanz, und infolgedessen starb auch der Organismus der Zuckerrübe ab. Hier zeigt sich uns ein interessanter physiologischer Vorgang, wonach die

kleinsten Spuren von Kalium-Ion, die in dem Nährmedium nicht mehr chemisch nachweisbar waren, durch die Eklektivitätigkeit des Wurzelsystems der Zuckerrübe aufgespeichert wurden, um das Leben der Zuckerrübe zu sichern.

Durch die Ernährungsbilanz ist bewiesen worden, daß eine Menge von 0,0002 g Kaliumoxyd pro Pflanze für den Bau- und Betriebsstoffwechsel der Pflanze nicht genügt. Der innere Rhythmus der Assimilationsvorgänge hat so eine Hemmung erfahren, daß die Assimilate in Form von Stärke in den Chlorophyllkörpern kaum nachgewiesen werden konnten.

Infolgedessen ist eine so minimale Menge von Kaliumoxyd, die in einem Samen 0,0000294 g beträgt, für den Aufbau des Körpers und zur Energiegewinnung einer Rübenpflanze nicht hinreichend.

Die Anschauungen Weevers, daß die Zuckerrübensamen ziemlich viel Kalium enthalten, zeigen deutlich, daß er über den Kaliumgehalt der Zuckerrübensamen sehr schlecht orientiert ist.

Wir bestimmten bei den Kulturen im Nährmedium mit und ohne Kalium-Ion den Stickstoff in Form von Eiweiß und den Zucker, jedoch haben sich die Pflanzen im Nährmedium ohne Kalium sehr schwach entwickelt (100 Pflanzen wogen in der Trockensubstanz 5,51 g), und infolgedessen war es notwendig, die Versuche nochmals zu wiederholen. Deshalb stellten wir neue Versuche an zwecks Lösung des Problems, ob sich das Kalium-Ion an der Eiweißsynthese in der Pflanzenzelle beteiligt. Die Resultate sind in meinem Buche „Beiträge zur Kenntnis der Ernährung der Zuckerrübe. Physiologische Bedeutung des Kalium-Ions im Organismus der Zuckerrübe“ publiziert worden.

Was für kleine Quantitäten von Kalium-Ion die Kulturen in dem Nährmedium ohne Kalium-Ion aufweisen, dokumentieren die von uns gewonnenen Daten.

Der Kaliumgehalt hat sich in folgender Weise gestaltet: Bei Abwesenheit von Kalium-Ion im Nährmedium.

In einer Pflanze befanden sich:

Am 3. Juli	0,029 g Kaliumoxyd,
am 25. Juli	0,029 „ „
am 30. September . . .	0,030 „ „

Bei Gegenwart von Kalium-Ion

am 3. Juli	2,264 g Kaliumoxyd,
am 25. Juli	2,926 „ „
am 30. September	3,383 „ „

Wie aus diesen Zahlen erhellt, enthalten die Pflanzen im Nährmedium ohne Kalium-Ion größere Quantitäten von Kalium als bei den ersten Versuchen, weshalb sie auch nicht abgestorben sind. Bis Ende Juli haben sich die Pflanzen entwickelt, dann aber sind sie schon nicht mehr weiter gewachsen, und es machten sich bei ihnen Kaliummangelercheinungen stark bemerkbar. Ich muß zugeben, daß diese Experimente nicht so günstig ausgefallen sind wie die ersteren, aber trotzdem entfiel auf 100 g resorbierten Kaliumoxyds der Normalpflanzen nicht einmal 1% des Kaliumoxyds der kaliumarmen Vegetation. Bei den ersten Experimenten kamen auf 100 g resorbierten Kaliumoxyds der Normalpflanzen 0,014% des Kaliumoxyds der kaliumarmen Vegetation.

Diese ganz minimale Menge von Kalium-Ion macht sich in der lebenden Substanz in der Weise fühlbar, daß Symptome einer Depression jener Aufbauprozesse auftreten, an denen das Kalium-Ion am meisten beteiligt ist, und das ist die Synthese der Kohlenhydrate, was auch im weiteren Verlauf der Entwicklung der Pflanzen konstatiert wurde.

Wenn der Pflanzenorganismus im Nährmedium ohne Kalium-Ion gegenüber den Normalpflanzen so minimale Quantitäten von Kalium-Ion aufweist, so muß sich logischerweise die Dynamik der Auf- und Abbauprozesse auch ganz anders gestalten als bei den Normalpflanzen. Der adnormale Betriebsstoffwechsel muß bei solchen Pflanzen in prägnanter Weise zum Vorschein kommen, und das war bei unseren Versuchen auch bei starkem Kaliummangel tatsächlich der Fall.

Die Schlüsse, die Weevers aus meinen Versuchsergebnissen zieht, entbehren jeder realen Grundlage.

Unsere Vegetationsversuche können als einwandfrei bezeichnet werden, da wir alle Methoden, die uns zu Gebote standen, verwendeten, um die Pflanzen womöglich bei ganz kleinen Mengen von Kalium-Ion zur Entwicklung zu bringen.

Interessant ist ferner, wie Weevers meine Befunde unrichtig auffaßt und auslegt, denn er sagt:

„Stoklasa zieht diese Folgerung aus den Werten des Eiweißstickstoffes und Zuckergehalts, in Prozenten des Trockengewichtes ausgedrückt, und hat dann dem Anschein nach recht. Für Eiweißstickstoff sind die Werte in den Pflanzen ohne Kalium fast denjenigen der Kontrollpflanzen gleich, für Zucker sind sie um die Hälfte niedriger. Jedoch muß man hier nicht mit Prozentwerten, sondern mit den absoluten Werten Rechnung halten, und dann wird das Ergebnis ein ganz anderes. Berechnet (aus Stoklasas Protokollen) sind die Werte für Wurzel, Blätter und Stiele zusammen usw.“

Hier muß ich meiner Verwunderung über Weevers Behauptung Ausdruck geben. Ich habe doch bei meinen Versuchen nicht bloß mit Prozentwerten, sondern auch mit absoluten Werten kalkuliert; die von Weevers angegebenen Daten stammen von mir, wie sich ein jeder davon auf Seite 141 bis 143 meiner Arbeit: „Ist das Kalium-Ion an der Eiweißsynthese in der Pflanzenzelle beteiligt?“ überzeugen kann. Weevers hat diese Daten nicht berechnet, sondern von mir einfach übernommen. Und gerade bei genauerer Beobachtung dieser Zahlen ist es auffallend, was für ungeheure Differenz zwischen dem Aufbau der Eiweißstoffe und des Zuckers zu verzeichnen sind.

Wenn man die gefundenen Resultate umrechnet, um zu ermitteln, wieviel auf 1 g Stickstoff in Eiweißform Zucker entfällt, so ergeben sich interessante Daten:

Bei Abwesenheit von Kalium-Ion im Nährmedium:

am 3. Juli	9,74 g Zucker,
am 25. Juli	15,94 " "
am 30. September . . .	15,74 " "
am 21. Oktober	10,66 " "

Diese Zahlen lehren, daß im Nährmedium bei Abwesenheit von Kalium-Ion die Verhältnisse nicht wesentlich differieren. Die äußerste Grenze des erforderlichen Kaliums zeigt sich am deutlichsten am 21. Oktober, wo das Verhältnis fast dasselbe war wie bei Beginn der Vegetation.

Bei den Kontrollpflanzen bei Gegenwart von Kalium-Ion im Nährmedium wurden pro 1 g Stickstoff in Eiweißform

am 3. Juli	9,34 g Zucker,
am 25. Juli	19,87 " "
am 30. September . . .	37,22 " "
am 21. Oktober	47,19 " "

produziert.

Ganz anders gestalten sich die Verhältnisse dagegen bei den Kontrollpflanzen bei Gegenwart von Kalium-Ion. Hier werden durch die fortwährende Resorption des Kalium-Ions immer große Mengen von Zucker produziert, so daß am 30. September auf 1 g Stickstoff in Eiweißform schon 37,22 g Zucker entfallen, also viermal soviel als am 3. Juli.

Wir haben die Zuckerrübenpflanzen noch weiter in ihrer Entwicklung beobachtet, nachdem im Oktober viele schöne sonnige Tage waren und bekanntlich die Energie der Sonnenstrahlen ungemein auf die Bildung der Kohlenhydrate wirkt. Am 21. Oktober wurden durchschnittlich in der Trockensubstanz einer Normalpflanze 2,106 g Stickstoff in Eiweißform und 99,4 g Zucker konstatiert, so daß auf 1 g des Stickstoffs in Eiweißform 47,19 g Zucker entfallen. Am 30. September fanden wir 2,001 g Stickstoff in Eiweißform und 74,489 g Zucker. Würde die Hypothese Weevers, daß das Kalium sich am Auf- und Abbau der Eiweißstoffe beteiligt, richtig sein, müßten ganz andere Verhältnisse herrschen. Der Stickstoff in Eiweißform ist vom 3. Juli bis zum 21. Oktober fast gleich geblieben, der Zuckergehalt dagegen ist während der größeren Aufnahme von Kalium-Ion stark gestiegen. Die Zuckerrübenpflanzen sind bei Abwesenheit von Kalium im Nährmedium am 21. Oktober ganz abgewelkt, und die chemische Analyse im ganzen Organismus ergab durchschnittlich 0,368 g Stickstoff in Eiweißform und 3,923 g Zucker. Am 30. September wurden 0,307 g Stickstoff in Eiweißform und 4,833 g Zucker konstatiert. Die Menge der Eiweißstoffe ist während der letzten Vegetationsperiode gestiegen, während die des Zuckers gesunken ist. Wir müssen annehmen, daß eine Synthese der Eiweißstoffe, aber nicht des Zuckers vor sich gegangen ist. Die Menge des Zuckers ist deshalb gesunken, weil ein Teil davon für die physiologische Verbrennung und ein anderer zur Bildung neuer Organe benutzt wurde.

Die lebende kaliumhungrige Substanz besitzt nicht die

Fähigkeit, die charakteristische Speicherung und Mobilisierung der Saccharose hervorzurufen.

Die Ansammlung der Energie in den Stoffwechselprodukten, also in Gestalt des chemischen Potentials für die Vegetation ist in dem Nährmedium mit und ohne Kalium-Ion so verschieden, daß sie jedem Beobachter gleich ins Auge fällt.

Wie sich das Kalium-Ion bei der Photosynthese beteiligt, merkt man am deutlichsten, wenn wir nicht allein den Gehalt an Mono- und Disacchariden in Betracht ziehen, nachdem ja noch andere Kohlenhydrate, namentlich Hemicellulosen, Cellulosen, Pentosane usw. vorhanden sind, sondern den gesamten Kohlenstoffgehalt der Pflanze in verschiedenen Vegetationsperioden.

Auch der Kohlenstoffgehalt der hochmolekularen Verbindungen der Eiweißstoffe und der Fette hat seinen Ursprung in dem ersten photosynthetischen Produkte bei der synthetischen Bildung der organischen Substanz, namentlich der Kohlenhydrate.

Während der ganzen Vegetation werden gemäß unseren Untersuchungen¹⁾ von der Gesamtmenge des aus der Luft assimilierten Kohlenstoffs 40 bis 56%₀ ausgeatmet. Natürlich ist die Dynamik der Atmungsintensität bei den kaliarmen Pflanzen viel geringer als bei den Normalpflanzen, worauf ich schon in meiner Abhandlung über die Aufgabe des Kalium-Ions bei der physiologischen Verbrennung hingewiesen habe. Das Quantum des assimilierten Kohlenstoffs bei den Normalpflanzen war bedeutend größer als bei den Pflanzen, die sich in einem Nährmedium ohne Kalium-Ion entwickelten. Bei der Periode der intensivsten Assimilationsvorgänge, wo namentlich die Aufspeicherung und Mobilisierung der wichtigsten Reservestoffe vor sich geht, reichen diese kleinen Kalium-Ion-Mengen bei denjenigen Pflanzen, die sich in einem Nährmedium ohne Kalium entwickelten, nicht aus, und die Pflanzen bleiben in ihrer Entwicklung stark zurück.

Unsere Experimente setzten wir bei Einhaltung aller Vorsichtsmaßregeln weiter fort, um die physiologische Bedeutung

¹⁾ Siehe meine Arbeit: Beiträge zur Kenntnis der Ernährung der Zuckerrübe. Physiologische Bedeutung des Kalium-Ions im Organismus der Zuckerrübe. Gustav Fischer, Jena 1916.

des Kalium- und Phosphat-Ions im Organismus der Zuckerrübe zu verfolgen.

Wir bestimmten im Nährmedium mit und ohne Kalium-Ion und mit und ohne Phosphat-Ion die Eiweißstoffe und den Zucker¹⁾. 100 Keimlinge wiesen in der Trockensubstanz ein Gewicht von 0,232 bis 0,244 g auf, also durchschnittlich ein solches von 0,238 g. Von Kaliumoxyd waren 0,003 g, von Phosphorsäureanhydrid 0,006 g vertreten.

Nach 53 Vegetationstagen betrug das Gewicht von 100 Pflanzen in der Trockensubstanz

im Nährmedium ohne Kalium-Ion	4,69 g,
im Nährmedium bei Gegenwart aller Nährstoffe	4118,00 g.

Im Nährmedium ohne Phosphat-Ion sind die Pflanzen schon nach 48 Vegetationstagen abgestorben, und das durchschnittliche Gewicht von 100 Pflanzen betrug in der Trockensubstanz 1,095 g.

Im Nährmedium bei Gegenwart aller Nährstoffe 3955,000 g.
Der Kaliumoxydgehalt betrug bei 100 Pflanzen in der Trockensubstanz bei Abwesenheit von Kalium-Ion im Nährmedium 0,0202 g,
bei Anwesenheit von Kalium-Ion im Nährmedium 146,8720 g.

Der Phosphorsäureanhydridgehalt in der Trockensubstanz von 100 Zuckerrübenpflanzen betrug bei Abwesenheit von Phosphat-Ion im Nährmedium 0,011 g,
bei Gegenwart aller Nährstoffe im Nährmedium 38,550 g.

Die Zuckerrübenpflanzen haben sich bei Abwesenheit von Phosphat-Ion im Nährmedium viel mangelhafter entwickelt als bei Gegenwart von Kalium. Ohne Kalium-Ion im Nährmedium sind die Pflanzen erst nach 53 Vegetationstagen abgestorben, während jene, die sich in einem Nährmedium ohne Phosphat-Ion entwickelten, schon nach 48 Vegetationstagen zugrunde gegangen sind.

Äußerst interessant war der Eiweißgehalt der Blätter, den wir nach dem makroskopischen Verfahren von Molisch²⁾ be-

¹⁾ Die Resultate unserer diesbezüglichen Untersuchungen werden in meiner Arbeit „Physiologische Bedeutung des Phosphat-Ions im Pflanzenorganismus“ publiziert.

²⁾ Molisch, Zeitschr. f. Botan. 8, 124 bis 131, 1916.

stimmten. Nach der Ansicht Molischs ist die Hauptmasse von Eiweiß der Blätter in den Chromatophoren vorhanden. Diese Annahme wird auch durch die neueste Arbeit von Georg Lakon¹⁾, ausgeführt im Botanischen Institut zu Hohenheim, vollkommen bestätigt.

Bei unserer makroskopischen Untersuchung mit den bekannten Eiweißreaktionen haben wir gefunden, daß die Chromatophoren der Blätter jener Pflanzen, die sich in einem Nährmedium ohne Kalium-Ion entwickelten, stets eiweißhaltig waren und die Eiweißreaktionen sehr deutlich zutage treten. Dagegen konnte bei den Chromatophoren der Blätter solcher Pflanzen, die sich in einem Nährmedium ohne Phosphat-Ion entwickelten, keine merkbare Eiweißreaktion beobachtet werden. Die Normalpflanzen zeigten stets, daß die Chromatophoren reich an Eiweiß sind und daß die Hauptmasse des Eiweiß der Blätter tatsächlich in den Chromatophoren vorhanden ist, in denen wir schon längst von den biogenen Elementen Phosphor, Kalium und Magnesium nachgewiesen haben. Daß die Chromatophoren reich an Eiweiß sind, ist bereits unzweifelhaft sichergestellt worden, nur Herr Weevers will behaupten, daß die Chromatophoren frei von Kalium sind, aber dessenungeachtet erklärt er, daß das Kalium an der Eiweißsynthese beteiligt ist. Das ist gewiß ein Paradoxon!!

Nach meinen Erfahrungen steht der Aufbau der Eiweißkörper, sowie der Eiweißstoffumsatz innig mit dem Phosphor und Magnesium, aber nicht mit dem Kalium im Zusammenhange.

Dem Kalium ist bei dem Assimilationsprozesse eine wichtige Rolle zugewiesen²⁾.

Die letzte Behauptung Weevers, daß meine Versuche über die Eiweißsynthese bei künstlicher Ernährung der jungen Pflanzen nicht den Wert besitzen, der ihnen beigemessen wird, beweist, daß er in der biochemischen Experimentaltechnik nicht versiert ist. Er äußert sich in nachstehender Weise:

„Die Versuche, die Stoklasa mit künstlich ernährten Zuckerrübenkeimlingen anstellte, sind für die Frage nach der Bedeutung des Kaliums im Stoffwechsel wertlos, denn beim Ende der Versuche hatten die an-

¹⁾ Georg Lakon, diese Zeitschr. 78, 3. u. 4. Heft, 1916.

²⁾ Die Resultate unserer weiteren Experimente mit Hilfe der Wasserkulturen mit Gerste, Mais und Tabak werden demnächst publiziert.

geblich ohne Kalium entwickelten Pflanzen ein Trockengewicht von 43 bis 47 mg. Diese Werte sind so klein, daß schon der Kaligehalt der Keimlinge fast für derartige Zwergpflanzen ausreichen kann und wiederum höchstens von Kalimangel, nicht von Abwesenheit des Kaliums die Rede sein konnte.“

Diese Äußerung Weevers ist genau so wie seine übrigen aus der Luft gegriffen.

Wir haben die Kulturen für unsere Versuche in Vegetationsgefäßen gezüchtet, deren Glaswände mit einer Paraffinschicht versehen und mit einer von Nährlösung getränkten Watte gefüllt war. Die Keimlinge im Nährmedium ohne Kalium-Ion haben, wie wir uns überzeugten, fast gar kein Kalium aus dem Nährmedium resorbiert und waren bloß auf diejenige Menge angewiesen, die sich in dem Samen befand.

Weevers ist in der irrigen Meinung, daß eine Samenpflanze 50 mg wiegt und nach 23tägiger Entwicklung noch genügend Kalium im Organismus zugegen ist.

Das ist aber eine ganz irrige Annahme!

Das Trockensubstanzgewicht von 1000 Keimlingen nach 9tägiger Entwicklung beläuft sich auf 2,38 g, also pro 1 Exemplar auf 0,00238 g. In der Trockensubstanz von 1000 Exemplaren befinden sich 0,03 g, in jener eines Exemplars 0,00003 g Kaliumoxyd. Das sind gewiß bedeutende Differenzen zwischen den Angaben Weevers und den tatsächlichen Befunden.

Die ermittelte Kalimenge hat während des Versuches nicht zugenommen, so daß unsere Kulturen fast gar kein Kalium enthielten, und deshalb sind die Resultate in dem Nährmedium ohne Kalium-Ion so günstig ausgefallen. Mit Rücksicht darauf können wir bei unseren Versuchen ganz gut von einer Abwesenheit des Kaliums bei der Entwicklung der Pflanzen sprechen. Während der Entwicklung betrug bei unseren Experimenten das Trockensubstanzgewicht von 1000 Pflanzen nach 23tägiger Entwicklung minimal 11,2 g, maximal 50,54 g. Das waren im Verhältnisse zu dem ursprünglichen Gewicht der Keimlinge keine Zwergpflanzen.

Überdies fällt das Gesamtgewicht der einzelnen Pflanzen nicht so in die Wagschale; die Hauptsache ist, wenn man über ein genügendes Material zur chemischen Analyse verfügt. Aus

diesem Grunde haben wir auch Versuche in größerem Maßstabe ausgeführt.

Alle Behauptungen Weevers über den K-Reichtum der Pflanzen, die sich in dem Nährmedium ohne Kalium-Ion entwickelten, rühren davon her, daß Weevers nicht zu unterscheiden weiß, was ein Rübenknäuel und ein Rübensamen ist. Das ist ein Fehler, den man einem Botaniker nicht entschuldigen kann.

Aus all dem Vorstehenden erkennt man ganz deutlich, daß Weevers in seinen Äußerungen etwas zu weit gegangen ist, die unberechtigte Angriffe darstellen. Da seine Ausführungen gegen meine langjährigen, mühevollen und zeitraubenden Versuche einen Mangel an biochemischer Sachkenntnis dieses Gebietes verraten, erkläre ich, daß ich auf evtl. weitere Auslassungen von dieser Seite nicht mehr zu antworten gedenke.

Ein neues Reagens auf Phloroglucin, Catechin und ihre Derivate, sowie über die Verbreitung derselben im Pflanzenreiche.

Von

Marianne Joachimowitz.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der k. k. Universität in Wien;
Nr. 104 der zweiten Folge.)

(Eingegangen am 20. April 1917.)

Einleitung.

Seitdem Tichomirow ¹⁾ im Fruchtfleische der Dattel eigenartige Zellinhaltskörper „inclusions intracellulaires“ gefunden und beschrieben hat, halten die Inklusen das Interesse der Forscher wach, und bis in die jüngste Zeit ist eine große Zahl von Arbeiten ihrem Studium gewidmet. In engem Zusammenhang damit suchte man die Beziehungen des Phloroglucins und seiner Derivate zu den Inklusen und seine biologische Rolle für die Pflanze klarzustellen.

Aus der Literatur ²⁾ geht hervor, daß man unter Inklusen eigenartige Zellinhaltskörper von gelber bis brauner Farbe versteht, die hauptsächlich in Früchten und Blättern verschiedener Pflanzen gefunden wurden. Als charakteristisch werden die Reaktionen mit Alkali, Eisensalzen und mit Vanillin-Salzsäure angegeben. In einer bassorinartigen Grundsubstanz enthalten

¹⁾ W. Tichomirow, Bull. d. Congr. intern. d. Bot. de St. Pétersbourg, S. 79.

²⁾ H. Molisch, Mikrochemie der Pflanze, G. Fischer, Jena 1913. — O. Tunmann, Pflanzenmikrochemie, Bornträger, Berlin 1913. In beiden Büchern die Literatur bis 1913. — Derselbe, Verhdl. d. Ges. Deutsch. Naturf. u. Ärzte, 85. Vers. (1913), II. 1. Hälfte 501. — H. Molisch, Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. Wien., Abt. I. 124, 507, 1915. — E. Senft, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 34, 710, 1916.

sie Phloroglucotannoide. Ihre biologische Rolle wird als eine dem Kerngummi ähnliche angesehen (Tunmann). Molisch spricht den Gerbstoffvakuolen in *Mimosa pudica* und anderen Leguminosen eventuell eine Bedeutung bei der Regulierung des Turgordruckes innerhalb der Gelenke zu. Dabei nimmt der Autor einen engen entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhang, sogar Identität zwischen den von ihm beschriebenen Gerbstoffvakuolen und Inklusen an. Nach E. Senft kommt ihnen unter anderem die Aufgabe zu, der Pflanze einen mechanischen Schutz zu gewähren und infolge der festen Bindung von Wasser die Transpiration wesentlich zu reduzieren, wodurch das Eintrocknen der Blätter und der Früchte gehindert werden soll. Was das Phloroglucin betrifft, so wird sein Vorkommen in den Pflanzen in freier Form bezweifelt, wobei man sich hauptsächlich auf die Befunde von Hartwich und Winckel¹⁾ stützt.

Um der Lösung der Frage nach der Bedeutung des Phloroglucins für die Pflanze, nach dem Wesen der Inklusen und der Beziehung des Phloroglucins zu den Inklusen näher zu kommen, erscheint es wohl zunächst notwendig, auf möglichst breiter Grundlage die Verbreitung des Phloroglucins und seiner Derivate im Pflanzenreiche zu studieren, seine Verteilung auf einzelne Pflanzenorgane, dann seine Entstehung und seine Veränderungen in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze zu untersuchen. Schließlich werden zur endgültigen Prüfung der so gebildeten Ansichten physiologische Experimente sich anschließen müssen.

Die vorliegende Arbeit gibt nun Aufschluß über die Verbreitung von Phloroglucinderivaten im Pflanzenreich und schließt sich damit an die Arbeit von Waage²⁾ an. Für den pflanzenmikrochemischen Nachweis der Phloroglucinverbindungen steht eigentlich, da das Weselskysche Reagens (Anilin und Toluidinitrat und Alkalinitrit) sich nicht bewährt hat, nur ein Reagens in Anwendung. Es ist das Lindtsche Reagens, bekanntlich Vanillin-Salzsäure. Sowohl freies Phloroglucin als auch Phloroglucinderivate nehmen bei Zusatz des Reagens eine kirschrote Farbe an. Trotzdem auch andere Stoffe, insbesondere Phenole

¹⁾ Hartwich und Winckel, Arch. d. Pharm. 242, 462, 1904.

²⁾ Th. Waage, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 8, 250, 1890.

in mehr oder minder starkem Grade mit Vanillin-Salzsäure reagieren, bezieht man doch einen positiven Ausfall der Reaktion im pflanzlichen Gewebe mit gewissen Einschränkungen auf Phloroglucinderivate, wenigstens wird für die Inklusen keine andere Deutung in Betracht gezogen; ja, wie die Abhandlung von Hartwich und Winckel zeigt, wird bei *Quercus spec.* und *Cinchona spec.* aus dem Auftreten der Reaktion auf den phloroglykotannoiden Charakter der vorhandenen Gerbstoffe geschlossen.

Bewährte sich auch im allgemeinen das Lindtsche Reagens, so mußte doch vorher durch Versuche festgestellt werden, ob der notwendigen Forderung nach einer möglichst großen Empfindlichkeit Genüge geleistet ist, oder ob nicht ein empfindlicheres Reagens existiere. Denn nur eine sehr empfindliche Probe bietet die Gewähr dafür, daß die Phloroglucinderivate in ihren frühesten Entwicklungsstadien gefaßt werden können. Auf Anraten des Herrn Professor Molisch wurde zu diesem Zwecke eine Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Schwefelsäure versucht, die tatsächlich, wie gleich vorweggenommen sei, in doppelter Hinsicht die Vanillin-Salzsäure übertrifft. Bei sonst gleichem reaktionellen Verhalten in einer bestimmten Konzentration zeichnet sie sich einerseits durch größere Empfindlichkeit und rascheres Eintreten der Reaktion, andererseits durch längere Haltbarkeit aus.

Der p-Dimethylaminobenzaldehyd wurde von mehreren Autoren für die Charakterisierung verschiedener Verbindungen eingeführt, unter anderm erwähnt Raciborski¹⁾ kurz, daß Phloroglucin damit reagiere. Zunächst angestellte Versuche ergaben, daß der p-Dimethylaminobenzaldehyd mit den verschiedenen Verbindungen ganz verschieden reagiert, je nach seiner Konzentration und der Konzentration der angewandten Säure; schließlich ist es für den Ausfall der Reaktion naturgemäß nicht gleichgültig, ob Salz- oder Schwefelsäure als Lösungsmittel dient. Für den Nachweis der Phloroglucinverbindungen erwies sich die nachfolgende Zusammensetzung am geeignetsten: 0,5 g p-Dimethylaminobenzaldehyd werden in 8,5 g konz. Schwefelsäure gelöst und 8,5 g Wasser hinzugefügt.

¹⁾ M. Raciborski, Bull. de l'Acad. de Cracovie 1906, 553.

II. Versuche mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (D.) und Vanillinsalzsäure (V.).

A. Bei verschiedenen Substanzen.

Fügt man zu einem Körnchen Phloroglucin D. hinzu, so färbt es sich sogleich intensiv rot; V. löst das Phloroglucin zunächst farblos auf, und erst in der Lösung gelangt ein sehr feinflockiger Niederschlag von intensiv roter Farbe zur Ausscheidung. Eine verdünnte alkoholisch-wässrige Phloroglucinlösung färbt sich mit D. augenblicklich rosa, dann rasch rot, schließlich entsteht ein roter Niederschlag, während bei V. die Lösung auch nach einigen Stunden kaum rosa gefärbt erscheint. Auf den geschilderten Empfindlichkeitsunterschied ist es zurückzuführen, daß auch im Pflanzengewebe die Reaktion mit D. immer schärfer, rascher und besser lokalisiert auftritt als mit V. Der gleiche Empfindlichkeitsunterschied konnte auch bei den andern durchgeprüften Stoffen wahrgenommen werden:

Thymol wird mit D. innerhalb einer halben Stunde hellrosa, bei V. ist eine deutliche Färbung nicht sichtbar.

Resorcin färbt sich mit D. sogleich rosa, im Laufe von 15 Minuten rotviolett, mit V. in einer Stunde rotviolett.

Orcin verhält sich wie Resorcin, nur tritt die Reaktion rascher ein.

Brenzcatechin und Hydrochinon reagieren in der Kälte weder mit D. noch mit V.

Desgleichen erzielt man bei den folgenden Verbindungen keine Färbung:

Pyrogallol (hier war nach einigen Stunden mit D. eine kaum sichtbare Rosafärbung zu beobachten).

Chinon,	Tyrosin,
die 3 Monoxybenzoesäuren,	Mekonsäure,
Protocatechusäure,	α - und β -Naphthol,
β -Resorcylsäure,	Menthol,
Gentisinsäure,	Cholesterin,
Gallussäure,	Cumarin,
Pyrogallolcarbonsäure,	Aesculin und Aesculetin,
Chinasäure,	Quercitrin und Quercetin,
Kaffeesäure,	Morin,

Maclurin,
 Filicin,
 Arbutin,
 Coniferin,
 Saponin,
 Amygdalin,
 Salicin,
 Mannit,
 Quercit,
 Inosit,
 Rhamnose,
 d-Glucose,
 Maltose,
 Lactose,

Saccharose,
 Dextrin,
 Stärke,
 Glykogen,
 Inulin,
 Cellulose,
 fette Öle,
 Essigsäure,
 Oxalsäure,
 Apfelsäure,
 Weinsäure,
 Zitronensäure,
 Benzoesäure,
 Leucin.

Einige Alkaloide, wie Atropin, Cocain, Narkotin.

Bei Pyrogallol, Morin und Maclurin stehen die gemachten Beobachtungen nicht in Übereinstimmung mit den Angaben, die Tunmann¹⁾ nach Waage und Winckel anführt und die über mit Vanillin-Salzsäure bei den genannten Verbindungen erzielte Reaktionen berichten. Es sei dazu bemerkt, daß das von mir benutzte Reagens nach der Vorschrift Tunmanns¹⁾ hergestellt war und daß alle Angaben sich nur auf bei Zimmertemperatur erhaltene Reaktionen beziehen. Es wurden wohl auch in mehreren Fällen bei erhöhter Temperatur Versuche angestellt, doch wurde auf ihre Wiedergabe, als für den Endzweck der Arbeit belanglos, verzichtet. Von den weder mit D. noch mit V. reagierenden Stoffen sind besonders Hesperidin und Hesperetin, Quercetin, Filicin, Maclurin und Morin hervorzuheben. — Dagegen reagierten Catechin, Catechugerbsäure in der gleichen Weise und fast in der gleichen Intensität wie Phloroglucin. Phloretin färbte sich nach einigen Sekunden mit D. rosarot, mit V. allmählich gelbbrot, bei Phloridzin trat dieselbe Färbung im Verlaufe einiger Stunden ein. Gallusgerbsäure nahm nach 1¹/₂ Stunden eine kaum sichtbare Rosafärbung an, mit V. erfolgte in der gleichen Zeit keine Änderung.

Schließlich wurden noch verschiedene Eiweißarten unter-

¹⁾ O. Tunmann, Pflanzenmikrochem. 1913, 379.

sucht. Der Unterschied gegenüber Phloroglucin ist in die Augen springend. So zeigen Vitellin aus Pflanzen, Hühner-eiweiß, Zelleiweiß in verschiedenen Gewächsen (*Ricinus*, *Lupinus*, *Amygdalus*) mit D. eine ganz allmählich und bedeutend später auftretende, immer schwache, in manchen Pflanzengewebe kaum sichtbare Violett-Blaufärbung, mit V. eine Rosalilafärbung¹⁾. Die Färbung ist immer diffus und kann mit der Phloroglucinreaktion nicht verwechselt werden.

Zur Beantwortung der Frage, welche Komponenten des p-Dimethylaminobenzaldehydes die Reaktion bedingen könnten, wurden Versuche mit Benzaldehyd, p-Aminobenzaldehyd, Toluylaldehyd und p-Nitrobenzaldehyd in derselben Konzentration mit Schwefelsäure wie D. durchgeführt. In keinem Falle trat jedoch mit Phloroglucin eine charakteristische Färbung ein.

B. Versuche mit D. und V. bei Pflanzen.

✓ [Frisch (fr.) und Herbar (H.).]

Die nachstehend angeführten Untersuchungen wurden, wo es möglich war, an lebenden Pflanzen, sonst an Herbarmaterial, in vielen Fällen zur Kontrolle an beiden angestellt. Die untersuchten Organe sind namentlich angeführt. Es wurde auf die eintretende Rotfärbung geachtet, fanden sich Inklusen vor, so wurde die Reaktion mit Alkali usw. angeschlossen und die Löslichkeit der fraglichen Gebilde geprüft.

In den nachstehenden Tabellen sind die untersuchten Pflanzen nach Stämmen, Klassen, Reihen und Familien geordnet angeführt. Ein positiver Ausfall der Reaktion wurde mit +, ein negativer mit — bezeichnet.

III.

Diskussion der Resultate.

Um die Verbreitung von Phloroglucinderivaten im Pflanzenreiche zu studieren, welche Aufgabe als erste Etappe auf dem Wege zur Beantwortung der Frage nach der biologischen Rolle

¹⁾ O. Neubauer und E. Rohde, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **44**, erhalten mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in konzentrierter Schwefelsäure die gleichen Farbtöne; doch tritt die Reaktion dabei sofort und intensiv ein, im Gegensatz zu der oben angeführten Konzentration.

IV. Phaeophyta.

Phaeosporaeae:

- Sphaecelaria cirrhosa
- scoparia
- Cladostephus Myriophyllum
- Scytosiphon filum
- Striaria attenuata
- Dictyosiphon spec.
- Mesogloia vermiculata
- Stilophora rhizodes
- Alaria filum
- Laminaria saccharina
- debilis
- Cloustoni

Cyclosporeae:

- Padina Pavonia
- Dictyota dichotoma
- Himantalia lorea
- Fucus vesiculosus
- tuberculatus
- serratus
- nodosus

V. Rhodophyta.

Bangaeae:

- Bangia pallida
- Porphyra vulgaris

Florideae:

- Wrangelia penicillata
- Chondrus crispus
- Gigartina mamillosa
- Catenella Opuntia
- Hypnea confervoides
- Lomentaria articulata
- Aglaophyllum laceratum
- Chondria obtusa
- tenuissima

Phylloide, Cauloide,
Rhizoide

Phylloide, Gametangien
Thallus

"

"

Gesamter Thallus

"

"

"

"

Gesamter Thallus

"

"

"

"

"

"

"

"

"

"

Gesamter Thallus

"

"

"

"

"

"

"

"

"

"

Gametangien mit D. ebenso m. Schwefelsäure rosa gefärbt.

Es gelangte hier nur Herbarmaterial zur Untersuchung. In keinem Fall trat Rotfärbung ein, weder bei dem die natürl. Färbung nicht mehr zeigenden, noch bei den die natürl. Färbung mehr oder weniger aufweisenden Kotalgen. In letzterem Falle wurde eine Veränderung der Farbe mit D. nicht festgestellt.

Name der Stämme, Klassen, Reihen und Familien	Name der Pflanze	Name des unter- suchten Organs	Ausfall der Gerb- stoffreak- tion	Ausfall der Reaktion mit D.	Anmerkungen
Florideae:	<i>Polysiphonia variegata</i>	Gesamter Thallus	—	—	
	<i>Callithamnion roseum</i> — <i>cruciatum</i>	" "	—	—	
	<i>Ceramium rubrum</i> — <i>tenuissimum</i>	" "	—	—	
	<i>Halymenia edulis</i> <i>Corallina officinalis</i>	" "	—	—	
	<i>Ulva lactuca</i> — <i>latissima</i>	Gesamter Thallus	—	—	
	<i>Conferva</i> spec.	" "	—	—	
	<i>Draparnaldia glomerata</i> <i>Oedogonium capillare</i>	" "	—	—	
	<i>Hydrodictyon utriculosum</i> <i>Bryopsis plumosa</i> <i>Vaucheria clavata</i> — spec.	" "	—	—	
	<i>Caulerpa clavifera</i> — <i>Freyinetii</i>	" "	—	—	
	<i>Udotea Desfontainii</i> <i>Halimeda Tuna</i> <i>Chaetomorpha Linum</i> <i>Cladophora glomerata</i> <i>Chara</i> spec.	" "	—	—	Der Thallus nahm allmählich eine diffuse rosa Färbung an, die eindeutig untersehten ist von der Phloroglucinreaktion. Antheridien z. Teil rotgefärbt sowohl mit D. als mit Schwefeläure.
Fungi. Phycomycetes:	<i>Mucor mucedo</i> <i>Syncephalis</i> spec. <i>Albugo candida</i>	Gesamter Thallus	—	—	
Ascomycetes:	<i>Aspergillus herbariorum</i> — <i>niger</i> <i>Penicillium crustaceum</i> <i>Elaphomyces cervinus</i>	Gesamter Thallus	—	—	

<i>Peziza vesiculosa</i>	"	"	"
<i>Sclerotinia Fuckeliana</i>	"	"	"
<i>Geoglossum hirsutum</i>	"	"	"
<i>Helvella infula</i>	"	"	"
<i>Gyromitra esculenta</i>	"	"	"
<i>Morchella esculenta</i>	"	"	"
<i>Taber brumale</i>	"	"	"
— <i>aestivum</i>	"	"	"
— <i>magnatum</i>	"	"	"
<i>Balsamia vulgaris</i>	"	"	"
<i>Fusarium Solani</i>	"	"	"
<i>Claviceps purpurea</i>	"	"	"
<i>Ustilago Maydis</i>	Ganze Pflanze		
<i>Tilletia laevis</i>	"	"	"
<i>Auricularia auricula Indae</i>	"	"	"
<i>Tremella spec.</i>	"	"	"
<i>Clavaria Botrytis</i>	"	"	"
<i>Hydnum imbricatum</i>	"	"	"
<i>Fomes fomentarius</i>	"	"	"
<i>Polyporus confluens</i>	"	"	"
— <i>officinalis</i>	"	"	"
— <i>hispidus</i>	"	"	"
<i>Polystictus versicolor</i>	"	"	"
<i>Trametes suaveolens</i>	"	"	"
<i>Leuzites quercina</i>	"	"	"
<i>Boletus edulis</i>	"	"	"
<i>Cantharellus cibarius</i>	"	"	"
<i>Coprinus atramentarius</i>	"	"	"
<i>Lactaria torminosa</i>	"	"	"
<i>Russula vesca</i>	"	"	"
<i>Agaricus campestris</i>	"	"	"
— <i>muscarius</i>	"	"	"
<i>Scleroderma verrucosum</i>	"	"	"
<i>Lycoperdon Bovista</i>	"	"	"
— <i>caelatum</i>	"	"	"
<i>Bovista nigrescens</i>	"	"	"
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	"	"	"
Basidiomycetes:			
Fungi imperfecti:			

Name der Stämme, Klassen, Reihen und Familien	Name der Pflanze	Name des unter- suchten Organs	Ausfall der Gerb- stoffreak- tion	Ausfall der Reaktion mit D.	Anmerkungen
Lichenes:	<i>Verrucaria muralis</i>	Thallus		—	
	<i>Opegrapha involuta</i>	"		—	
	<i>Graphis scripta</i>	"		—	
	<i>Roccella fuciformis</i>	"		—	
	— <i>tinctoria</i>	"		—	
	<i>Lecidea decipiens</i>	"		—	
	<i>Rhizocarpon geographicum</i>	"		—	
	<i>Cladonia rangiferina</i>	"		—	
	<i>Stereocaulon tomentosum</i>	"		—	
	<i>Baeomyces byssoides</i>	"		—	
	<i>Lobaria Pulmonaria</i>	"		—	
	<i>Peltigera canina</i>	"		—	
	<i>Solorina saccata</i>	"		—	
	<i>Cetraria islandica</i>	"		—	
	<i>Ramalina fraxinea</i>	"		—	
	<i>Usnea barbata</i>	"		—	
VII. Cormophyta.					
Musci: Bryales	<i>Dicranum undulatum</i>	Gametophyt, Sporophyt		—	
	<i>Tortula subulata</i>	"		—	
	<i>Barbula fallax</i>	"		—	
	<i>Funaria hygrometrica</i>	"		—	
	<i>Bryum capillare</i>	"		—	
	<i>Mnium affine</i>	"		—	
	— <i>punctatum</i>	"		—	
	— <i>cuspidatum</i>	"		—	
	<i>Catharinaea undulata</i>	"		—	
	<i>Polytrichum commune</i>	"		—	
	<i>Plagiothecium Ruthei</i>	"		—	
	<i>Brachythecium velutinum</i>	"		—	
	<i>Rhynchostegium rusci-</i> <i>forme</i>	"		—	
	<i>Eurhynchium striatum</i>	"		—	

Sphagnales:	<i>Sphagnum cymbifolium</i>	"	"						
	— <i>fimbriatum</i>	"	"						
Andreaeales:	<i>Andreaea petrophila</i>	"	"						
Hepaticae: Jungermanniales:	<i>Madotheca platyphylla</i>	"	"						
	<i>Fegatella conica</i>	"	"						
Marchantiales:	<i>Marchantia polymorpha</i>	"	"						
	<i>Dumortiera arigua</i>	"	"						
	<i>Anthoceros laevis</i>	"	"						
Anthocerotales:	<i>Lycopodium clavatum</i>		Ganze Pflanze						
Pteridophyta: Lycopodiaceae:	— <i>chamaecyparissus</i>	"	"						
	<i>Selaginella helvetica</i>	"	"						
	— <i>Willdenowii</i>	"	"						
Selaginellales:	<i>Equisetum maximum</i>	"	"						
	— <i>arvense</i>	"	"						
Equisetinae:	<i>Equisetum hiemale</i>	"	"						
Filicinae: Ophioglossales:	<i>Botrychium Lunaria</i>		Fertil. u. steril. Sproß	+					
Marattiales:	<i>Angiopteris evecta</i>		Blattstiel, Blatt	+					
	<i>Polypodium montanum</i>		Blattstiel	+					
	— <i>vulgare</i>		Rhizom	+					
Filicales:	<i>Pteris oretica</i>		Blattstiel u. Spreite	+					
	<i>Pteridium aquilinum</i>		Blattstiel	+					
			Blatt	+					
	<i>Adiantum Capillus Veneris</i>		Blattstiel	+					
			Blatt	+					
	<i>Adiantum formosum</i>		Blatt	+					
			Sproß	+					

Im Grundparenchym und Phloem zahlreiche Zellen + Spreite:

Nur im Gefäßbündel +

Alle Zellen +

In fast allen Parenchymzellen + Gefäßbündel +

Gefäßbündelscheide schwach +

+ wie *Polypodium montanum*

Epidermis, Mesophyll, Leitbündelzellen +

Gefäßbündelscheide und einzelne Phloemzellen +

Im Gefäßbündel stark +, Mesophyll schwach +

Zahlreiche Mesophyllzellen, Sporangienwand, vereinzelt Tri-

chome +

Wie *Pteris* +

Name der Stämme, Klassen, Reihen und Familien	Name der Pflanze	Name des unter- suchten Organs	Ausfall der Gerb- stoffreak- tion	Ausfall der Reaktion mit D.	Anmerkungen
Filicales:	<i>Scolopendrium vulgare</i>	Blatt	+	Mesophyllzellen und Inklusen +	fr.
	<i>Gymnogramme leptophylla</i>	Blattstiel u. Spreite	+	Wie <i>Pteridium aquilinum</i> +	fr.
	<i>Asplenium molle</i>	" Blattspreite	+	Gefäßbündel und Mesophyllzellen besonders in dessen Umgebung +	fr.
	<i>Blechnum Spicant</i>	Blattstiel u. Rhizom	+	Zahlreiche Zellen des Grund- gewebes, Gefäßbündelscheide, viele Phloemzellen +	H.
	<i>Marsilia quadrifolia</i>	Ganze Pflanze		—	H.
	<i>Salvinia natans</i>	"		—	fr.
	<i>Cycas revoluta</i>	Samen	+	Im fleischigen Teil des Integu- ments typische Inklusen +	H.
	<i>Ginkgo biloba</i>	Zweig	+	Mark und Rinde enthalten zahl- reiche + Zellen	fr.
		Blattstiel	+	Um das Gefäßbündel einzelne Zellen, einige Sklerenchym- und Epidermiszellen +	fr.
		Blatt	+	In Mesophyll, Gefäßbündel und Epidermis verstreute Zellen +	
Cupressaceae:	<i>Taxus baccata</i>	Zweig	+	Zahlreiche Zellen in Mark, pri- märier Rinde und Epidermis +	fr.
		Nadel	+	Fast alle Epidermiszellen, im Meso- phyll einige auffallend grobe Zellen und viele Gefäßbündel- zellen +	
	<i>Cupressus sempervirens</i>	Stamm und Blatt	+	Sehr viele Zellen +	H.
	<i>Thuja occidentalis</i>	Zweig und Nadel	+	Stark +	fr.
	" orientalis	"	+	" +	H.
	<i>Juniperus Sabina</i>	"	+	+ +	H.
	" Virginiana	"	+	+ +	H.
	" communis	"	+	+ +	H.

— Oxycedrus	"	"	Stark +. Im Mesophyll typische Inklusen +	fr.
Abietaceae:				
<i>Abies alba</i>	Zweig		In der Rinde, im Periderm, Mark, besonders die äußersten Partien, und in den Markstrahlen zahlr. Zellen +. Das Lumen mancher Tracheiden auch +	fr.
	Nadel		Alle Hypodermisfasern zahlreiche Mesophyllzellen stark +; die übrigen Zellen außer der Epidermis schwach +	fr.
<i>Picea excelsa</i>	Zweig und Nadel		Wie <i>Abies</i> +	fr.
<i>Araucaria excelsa</i>	"		" " +	fr.
<i>Larix decidua</i>	"		" " +	H.
<i>Pinus montana</i>	"		" " +	fr.
<i>Ephedra distachya</i>	Stamm, Zweig, Wurzel		-; nur die Wurzel schwach +	H.
Guettinae:				
Angiospermae:				
Dikotyledones:				
Verticillatae:				
<i>Casuarina equisetifolia</i>	Größere u. kleinere Zweige		Zahlreiche Zellen im Mark und in der Rinde +	H.
Fagales:				
Betula-				
<i>Betula alba</i>	Blatt		Fast alle Zellen +, oft typische Inklusen +	H.
	Zweig		Rinde und Markkrone stark +, Mark schwach +	H.
<i>Alnus rotundifolia</i>	Blatt		Nur in den größeren Nerven einzelne Zellen und Inklusen +	H. Viele Inklusen bleiben braun gefärbt.
Fagaceae:				
<i>Castanea sativa</i>	Zweig		Wie <i>Betula</i> , nur viel schwächer +	H.
<i>Fagus silvatica</i>	Blatt, Zweig		Schwach +	H.
	"		Stark +, im Blatt zahlreiche Inklusen +	H.
<i>Quercus pedunculata</i>	Zweig		In der primären Rinde, im Phloem einzelne Zellen und Markstrahlen im Holz +	fr.
	Blatt		Alle Palisaden- und einzelne Mesophyllzellen +, typische Inklusen +	fr. und H.
	Fruchtblatt, -schale		Stark +	

Name der Stämme, Klassen, Reihen und Familien	Name der Pflanze	Name des unter- suchten Organs	Ausfall der Gerb- stoffreak- tion	Ausfall der Reaktion mit D.	Anmerkungen
Myricales. Myri- caceae:	<i>Myrica cerifera</i>	Blatt, Zweig,	+	Stark +, im Blatt typische In- klusen +	H.
	Juglandales:	<i>Juglans regia</i>	Zweig	+	Primäre Rinde stark +
— <i>nigra</i>		Blatt, Blattstiel Frucht	+	Nur Gefäßbündel + Exokarp in 2 bis 3 subepidermalen Zellreihen +. Samenhaut: zahl- reiche Zellen +	fr.
Salicales:		<i>Populus alba</i>	Zweig	+	Mark und Rinde: zahlr. Zellen +
	— <i>canescens</i>	Blatt	+	Epidermis und Gefäßbündel +	H.
	<i>Salix fragilis</i>	Zweig und Blatt	+	Wie <i>P. alba</i> +	H.
		Blatt	+	Mark und Rinde: zahlr. Zellen + Oberste Palisadenreihe und Gefäß- bündel +	H.
	— <i>pentandra</i>	Zweig und Blatt	+	Wie bei <i>fragilis</i> +	H.
— <i>alba</i>	"	+	" " " +	fr.	
Urticales: Mora- ceae:	<i>Morus alba</i>	Stamm und Blatt	+	—	H.
	<i>Chlorophora tinctoria</i>	Stammholz	+	—	H.
	<i>Ficus elastica</i>	Blatt	+	Zahlreiche Mesophyllzellen, be- sonders um das Gefäßbündel + An der Grenze der primären und sekundären Rinde große Zellen +	fr.
Cannabaceae:	<i>Cannabis sativa</i>	Zweig	+	Nur im Gefäßbündel Zellen + In der primären und sekundären Rinde einzelne Zellen +	H.
	Ulmaceae:	<i>Humulus Lupulus</i>	Blatt Sproß	+	Wie <i>Cannabis</i>
<i>Celtis</i>		Blatt	+	—	H.
<i>Ulmus scabra</i>		Zweig und Blatt Zweig	+	In der Markkronen zahlreiche, in der Rinde einzelne Zellen + An und in den Gefäßbündeln Zellen +	fr.

	— campestris	Zweig	+	Alle Zellen mit Ausnahme des Xylems + Im Mesophyll und Gefäßbündel typische Inklusen +	H.
Urticaceae:	<i>Urtica dioica</i>	Blatt	+	—	H.
	— <i>urens</i>	Wurzel	—	—	H.
	<i>Beckheria utilis</i>	Sproß, Blatt	+	Einzelne Zellen im äußersten Mark und Phloem + Beim Hauptnerv sehr selten eine Zelle des Grundparenchyms +	fr.
		Blatt	+		fr.
Santalales: San-					
talaceae:	<i>Thesium linophyllum</i>	Wurzel, Sproß	—	—	H.
Loranthaceae:	<i>Viscum album</i>	Sproß, Blatt	—	—	fr.
Polygonales:					
Polygonaceae:	<i>Rheum palmatum</i>	Infloreszenzstiel	+	In der primären Rinde alle, im Phloem u. Xylem einige Zellen +	H.
	<i>Polygonum fagopyrum</i>	Blattstiel	+	—	H.
	— <i>bistorta</i>	Sproß	+	Im Phloem und in der primären Rinde zahlreiche Zellen +	H.
	<i>Rumex acetosa</i>	"	+	do.	H.
		"	+	do.	H.
Piperales:	<i>Piper macrophyllum</i>	Blattstiel, Blatt			fr.
	— <i>elongatum</i>	Zweig, Blatt		—	H.
	— <i>nigrum</i>	" "		—	H.
Hamamelidales:					
Hamamelidaceae:	<i>Hamamelis virginiana</i>	Zweig	+	In der primären und sekundären Rinde und im Mark zahlreiche Zellen + Alle Palisaden, viele Mesophyll- und Gefäßbündelzellen + typische Inklusen + Primäre Rinde, einzelne Zellen des Weichbastes und oft Inhalt der Bastfasern + Alle Palisaden, im Gefäßbündel Phloem und Collenchym +	H.
		Blatt	+		fr.
Platanaceae:					
	<i>Platanus orientalis</i>	Zweig	+		fr.
		Blatt	+		fr.

Name der Stämme, Klassen, Reihen und Familien	Name der Pflanze	Name des unter- suchten Organs	Ausfall der Gerb- stoffreak- tion	Ausfall der Reaktion mit D.	Anmerkungen
Tricoccae:					
Euphorbiaceae:	<i>Euphorbia splendens</i>	Sproß	+	—	fr.
	<i>Croton Tiglium</i>	Zweig, Blatt	+	—	H.
	<i>Euphorbia Cyparissias</i>	Rhizom	+	In der primären Rinde und im Periderm + typische Inklusen, auch Holzmarkstrahlen + Zahlreiche Zellen +	H.
		<i>Radix</i>	+	—	H.
		Blatt	+	—	fr.
Buxaceae:	<i>Euphorbia carniolica</i>	Wurzel, Blatt	+	—	H.
	<i>Buxus sempervirens</i>	Zweig, Blatt	+	—	fr.
Centrospermae:					
Chenopodiaceae:	<i>Chenopodium bonus Hen- ricus</i>	Blüte, Blatt, Stengel, Wurzel	—	—	H.
	— album	Blatt, Wurzel	—	—	H.
	<i>Spinacia oleracea</i>	" "	—	—	fr.
	<i>Beta vulgaris</i>	" "	—	—	fr.
Amarantaceae:	<i>Amarantus retroflexus</i>	Blatt, Zweig	+	—	H.
Phytolaccaceae:	<i>Phytolacca decandra</i>	Blatt, Sproß	+	—	H.
Nyctaginaceae:	<i>Mirabilis Jalapa</i>	Blatt	—	—	H.
Aizoaceae:	<i>Mesembryanthemum spec.</i>	Sproß	+	Zahlreiche Parenchymzellen +	fr.
Cactaceae:	<i>Mamillaria centricirrha</i>	" "	—	—	fr.
	<i>Opuntia tomentosa</i>	" "	—	—	H.
Portulacaceae:	<i>Portulacca grandiflora</i>	Fruchtknoten, Stengel Blatt	—	—	H.
Caryophyllaceae:	<i>Silene inflata</i>				
	<i>Agrostemma Githago</i>	Stengel, Blatt,			
	<i>Dianthus Caryophyllus</i>	Frucht, Wurzel	—	—	H.
	<i>Stellaria glauca</i>				
	<i>Saponaria officinalis</i>	Blatt	+	—	Typische braun bleibende In- klusen.
	<i>Illecebrum verticillatum</i>				
Polykarpiceae:	<i>Canella alba</i>	Zweig, Blatt	+	—	H.
Magnoliaceae:					

Myristicaceae:	<i>Myristica moschata</i>	Zweig	+	In der primären Rinde, im Mark und in manchen Gefäßen + Einzelne Epidermis-, Parenchym-, fast alle Phloemzellen, einige Zellen des äußersten Markes + Epidermis +	H. fr. und H. fr.
Lauraceae:	<i>Cinnamomum ceylanicum</i>	Blattstiel	+		
	<i>Laurus nobilis</i>	Blatt	+	Alle Epidermiszellen, darunter noch 2 bis 3 Zellreihen, viele besonders große Zellen um das Gefäßbündel +	fr.
		Blattstiel	+	Alle Epidermiszellen, darunter noch 2 bis 3 Zellreihen, viele besonders große Zellen um das Gefäßbündel +	fr.
Aristolochiaceae:	<i>Aristolochia Clematidis</i>	Blatt	+	Einige Epidermis-, Palisaden- und Mesophyllzellen +	fr.
	<i>Asarum europaeum</i>	Stengel, Blatt	+	—	H.
Berberidaceae:	<i>Berberis vulgaris</i>	Stengel, Blatt, Wurzel Zweig	+	—	H.
		Blatt	+	Im Phloem parallel zum Cambium eine Reihe von Zellen +	fr.
Ranunculaceae:	<i>Mahonia spec.</i>	Blatt	+	Nur im Gefäßbündel +	fr.
	<i>Ranunculus acer</i>	Zweig und Blatt	+	—	fr.
	<i>Helleborus niger</i>	Sproß, Fruchtknoten	+	—	fr.
	<i>Clematis vitalba</i>	Sproß, Blatt, Blüte	+	—	fr.
Nymphaeaceae:	<i>Nymphaea alba</i>	Zweig, Blatt, Samen	+	—	fr.
Rhoeadales:		Blattstiel, Blatt	+	—	H.
Papaveraceae:	<i>Papaver somniferum</i>	Sproß	+	Im Phloem einige Zellen +	H.
		Wurzel	+	—	H.
	<i>Chelidonium majus</i>	Wurzel, Blatt, Rhizom	—	—	H. und fr.
Cruciferae:	<i>Biscutella laevigata</i>	Sproß	+	In der Nähe der Gefäße Zellen +	H.
	<i>Arabis turrita</i>	Wurzel, Stengel, Blatt	+	—	H.
	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Frucht, Stengel, Blatt	+	—	H.
	<i>Brassica oleracea</i>	Stengel, Blatt	—	—	fr.
Parietales:	<i>Cistus creticus</i>	Wurzel	+	Im Mark und in den Holzmarkstrahlen einige Zellen +	H.
Cistaceae:		Stamm	+	In der primären Rinde und im Mark namentlich in den äußersten Partien Zellen +	H.
		Blatt	+	Mesophyllzellen +	H.

Name der Stämme, Klassen, Reihen und Familien	Name der Pflanze	Name des unter- suchten Organs	Ausfall der Gerb- stoffreak- tion	Ausfall der Reaktion mit D.	Anmerkungen
Parietales:					
Droseraceae:	<i>Drosera rotundifolia</i>	Ganze Pflanze	+	—	H.
Violaceae:	<i>Viola silvestris</i>	Wurzel, Stengel Blatt	+	—	H.
	— spec.	Wurzel, Blatt, Stengel	+	Im Mesophyll + typische Inkluden	fr.
	— tricolor	Ganze Pflanze	+	—	H.
Begoniaceae:	<i>Begonia spec.</i>	Blattstiel	+	Im Phloem und unter der Epi- dermis einige Zellen +	fr.
Guttiferales:					
Theaceae:	<i>Thea sinensis</i>	Blattstiel	+	Alle Zellen des Grundgewebes +, Phloem diffus schwach +	fr.
		Blatt	+	Paisaden und Schwammparen- chym +	fr.
	<i>Camellia japonica</i>	Blattstiel	+	Sehr zahlreiche Zellen im Grund- parenchym, ein Kreis großer Zellen um das Gefäßbündel, Markstrahlen im Phloem und Xylem +	fr.
Guttiferae:	<i>Hypericum spec.</i>	Blatt	+	Im Mesophyll und Gefäßbündel viele Zellen +	fr.
		Zweig Blatt	+	In der Rinde diffus schwach +	H.
Columniiferae:					
Malvaceae:	<i>Althaea officinalis</i>	Sproß, Blatt	+	—	H.
	<i>Malva rotundifolia</i>	"	+	—	H.
	<i>Abutilon Thompsonii</i>	Blattstiel, Blatt	+	—	fr.
	<i>Tilia platyphylloides</i>	Zweig	+	Im Mark, besonders in den äußeren Partien, zahlreiche Zellen +	fr.
Tiliaceae:		Blatt	+	Stellenweise Epidermis- und Ge- fäßbündelzellen +	fr.
		Fruchtknoten, Griffel Anthere	+	Sehr stark +	fr.
			+	Schwach +	fr.

Grinales:					
Linaceae:					
Geraniaceae:					
	<i>Linum usitatissimum</i>	Wurzel, Stengel, Blatt	+	—	H.
	— <i>flavum</i>	" "	+	—	H.
	<i>Geranium Robertianum</i>	" Sproß	+	Im Gefäßbündel einige Phloem- und Holzparenchymzellen und um das Leitbündel ein Kreis von Zellen +	fr.
	— <i>spec.</i>	Blatt	+	Im Gefäßbündel einige Zellen +	fr.
	<i>Erodium cicutarium</i>	Wurzel	+	Jede Zelle stark +	fr.
		"	+	Nur unter der Epidermis einige Zellen +	fr.
Terebinthales:					
Rutaceae:					
	<i>Citrus Aurantium</i>	Frucht, Blatt, Zweig	+	—	H.
	<i>Ruta graveolens</i>	Sproß, Blatt	+	—	H.
Simarubaceae:	<i>Ailanthus glandulosa</i>	Zweig, Blattstiel	+	—	fr.
Polygalaceae:	<i>Polygala sanguinea</i>	Sproß	—	—	H.
	— <i>amara</i>	"	—	—	H.
Anacardiaceae:	<i>Rhus cotinus</i>	Zweig	+	In der Rinde viele, im Mark einige Zellen +	fr.
	— <i>typhina</i>	"	+	Fast alle Zellen im Mark und in der Rinde +	fr.
Aceraceae:	<i>Acer Pseudoplatanus</i>	Blattstiel	+	Wie <i>Rhus typhina</i>	fr.
		Blatt	+	Selten eine Zelle im Phloem	
		Zweig	+	—	
Hippocastanaceae:	<i>Aesculus Hippocastanum</i>	Blattstiel	+	In der primären Rinde und im Mark sehr zahlreiche, im Phloem einige Zellen +	fr.
		"	+	Wie Zweig, um das Gefäßbündel eine Reihe von Zellen und manche Bastfasern +	fr.
Celastrales:					
Aquifoliaceae:	<i>Ilex</i>	Zweig, Blatt	+	—	H.
Celastraceae:	<i>Evonymum europaeum</i>	Zweig	+	Im Mark und in der Rinde Zellen +	fr.
	<i>Catha edulis</i>	"	+	Wie <i>Evonymum</i> +	
		Blatt	+	Mesophyll- und Gefäßbündelzellen +	fr.

Name der Stämme, Klassen, Reihen und Familien	Name der Pflanze	Name des unter- suchten Organs	Ausfall der Gerb- stoffreak- tion	Ausfall der Reaktion mit D.	Anmerkungen
Rhamnales:					
Rhamnaceae:	<i>Rhamnus frangula</i>	Zweig Blatt	+	Rinde und stellenweise Periderm + Gefäßbündel +	H.
	— <i>cathartica</i>	Zweig und Blatt	+	Stark positiv, typische Inklusen +	fr.
Vitaceae:	<i>Vitis vinifera</i>	Zweig	+	In Mark, Phloem und primärer Rinde sehr viele, im Holz spär- liche Zellen + Wie bei <i>Vitis</i> +	fr.
	<i>Parthenocissus quinque- folia</i>	Zweig	+		
Rosales:					
Crassulaceae:	<i>Crassula imbricata</i>	Blatt	+	Sehr zahlreiche Epidermis- und Mesophyllzellen +	fr.
	<i>Echeveria glauca</i>	"	+	Wie <i>Crassula</i>	fr.
	<i>Sempervivum tectorum</i>	"	+	Wie <i>Crassula</i> ; gewöhnlich die Nebenzellen d. Spaltöffnungen +	fr. s. Brenner ¹⁾
Saxifragaceae:	<i>Ribes rubrum</i>	Sproß	+	Sehr viele Zellen im Mark und in der Rinde, einige im Holz +	fr.
		Blattstiel	+	Gefäßbündel und einzelne Skler- enchymzellen +	
	<i>Saxifraga spec.</i>	Blatt	+	Gefäßbündel, einige Epidermis-, Mesophyllzellen und Haare +	
	<i>Tolmiea Menziesii</i>	"	+	Gefäßbündel und Mesophyll- zellen +	fr.
Rosaceae:	<i>Rubus Idaeus</i>	Blattstiel	+	Unter der Epidermis 2 bis 3 Zell- reihen +, Phloem diffus +, manche Gefäßwand und Köpf- chen einiger Drüsenhaare +	fr.
	<i>Pirus communis</i>	Zweig	+	In der Rinde und im Mark zahl- reiche Zellen +	fr.
	<i>Prunus Cerasus</i>	Zweig, Blatt Zweig	+	Wie <i>Prunus</i> + Alle Zellen im Mark und in der Rinde, Markstrahlen im Phloem und Xylem +	fr.

	Blattstiel	+	Einzelne Parenchymzellen, um das Gefäßbündel eine Reihe von Zellen +	fr.
<i>Rosa spec.</i>	Blatt Zweig	+ +	Gefäßbündel + Im Mark und Phloem einige Zellen, einige Markstrahlen im Holz +	
	Fruchtknoten, Antherenwand, Frucht	+	Stark +	
Mimosaceae:				
<i>Mespilus germanica</i>	Frucht	+	Stark +, typische Inklusionen +	fr.
<i>Mimosa pudica</i>	Blattgelenk Blatt	+ +	Fast alle Grundparenchymzellen + Einige Epidermis- und Mesophyllzellen +	fr.
<i>Acacia Catechu</i>	Zweig	+	Mark, Markstrahlen, Rinde +	H.
— <i>hirta</i>	Blatt	+	Mesophyllzellen +	H.
	Zweig	+	Wie Catechu +	
	"	+	Im Mark, Phloem, in der primären Rinde und in den Markstrahlen	fr.
Papilionaceae:				
<i>Cercis siliquastrum</i>			sehr viele Zellen +	
	Blattstiel	+	Einige Zellen im Grundgewebe +, Gefäßbündel wie Zweig +	fr.
	Blatt	+	Palisaden- und Schwammparenchymzellen durchwegs +, stellenweise Epidermis +	fr.
<i>Coronilla varia</i>	Sproß und Blattstiel	+	Einige Zellen im Mark, Phloem und manche Gefäße +	fr.
	Blatt Zweig	+ +	Typische Inklusionen + Unter der Epidermis eine Reihe von Zellen, im Phloem und Mark einige Zellen und manche Gefäße +	fr.
<i>Robinia pseudacacia</i>				
	Blatt Zweig	+ +	Zahlreiche Mesophyllzellen + Im äußersten Mark viele, im Phloem einzelne grobe, im Querschnitt elliptische Zellen, einige Bastfasern, oft die Gefäßwand +	fr.
<i>Glycyrrhiza glabra</i>				

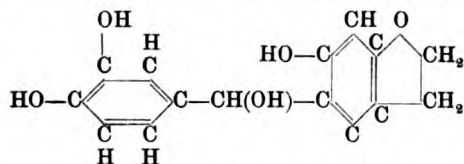
Name der Stämme, Klassen, Reihen und Familien	Name der Pflanze	Name des unter- suchten Organs	Ausfall der Gerb- stoffreak- tion	Ausfall der Reaktion mit D.	Anmerkungen
Tubiflorae:					
Labiatae:	<i>Majorana hortensis</i>	Stengel, Blatt, Blüte		—	H.
	<i>Origanum vulgare</i>	"	+	—	H.
	<i>Plantago officinalis</i>	Blatt, Blattstiel	+	—	H.
Plantaginaceae:					
Contortae:	<i>Gentiana acaulis</i>	Wurzel, Blatt	+	—	H.
Gentianaceae:	<i>Erythraea Centaurium</i>	Sproß, Blatt	+	—	H.
	<i>Menyanthes trifoliata</i>	"	+	—	H.
Menyanthaceae:	<i>Apocynum venetum</i>	Sproß	+	Im Mark u. in d. Rinde Inklusen +	H.
Apocynaceae:		Blatt	+	Im Mesophyll Inklusen +	fr.
	<i>Nerium Oleander</i>	Blatt, Blattstiel	schwach +	—	fr.
Asklepiadaceae:	<i>Hoya carnosa</i>	"	—	—	fr.
	<i>Cynanchum vincetoxicum</i>	Blatt, Sproß	—	—	H.
Ligustrales:					
Oleaceae:	<i>Ligustrum vulgare</i>	Zweig	—	—	fr.
	<i>Jasminum nudiflorum</i>	Zweig, Blatt	+	—	fr.
	<i>Forsythia spec.</i>	Zweig	+	—	fr.
Rubiales:					
Rubiaceae:	<i>Galium silvaticum</i>	Sproß, Blatt	+	—	fr.
	<i>Cinchona succirubra</i>	Stammrinde	+	Stark +	H.
Caprifoliaceae:	<i>Symphoricarpos racemosa</i>	Zweig	+	An der Grenze der primären und sekundären Rinde Zellen +, Gefäße oft +	fr.
	<i>Viburnum Opulus</i>	"	+	In der primären Rinde einige, im Phloem zahlreiche Zellen +, Korkwand +	fr.
	— <i>Lantana</i>	"	+	Primäre Rinde, Phloem, Holzmarkstrahlen und im äußersten Mark Zellen +	fr.
		Blatt	+	Gefäßbündel und Nebenzellen der Spaltöffnungen +	
Dipsacaceae:	<i>Scabiosa columbaria</i>	Wurzel, Stengel, Blatt	+	—	H.
	<i>Knautia arvensis</i>	"	+	—	H.

Name der Stämme, Klassen, Reihen und Familien	Name der Pflanze	Name des unter- suchten Organs	Ausfall der Gerb- stoffreak- tion	Ausfall der Reaktion mit D.	Anmerkungen
Liliiflorae: Liliaceae:	<i>Ophiopogon spicatus</i> <i>Curculigo recurvata</i> <i>Colchicum autumnale</i>	Blatt Blatt, Blattstiel Zwiebel	- - +	- - In der Zwiebelhaut inklusenartige Bildungen, die sich wie bei Gladiolus verhalten + Unter der Epidermis große Zellen +	fr. fr. H.
Juncaceae:	<i>Juncus trifidus</i> - <i>balticus</i> <i>Luzula campestris</i>	Blatt Wurzel, Halm, Blatt schwach + " " " Blatt	+ " +	- - Einige Zellen in der Nähe des Gefäßbündels +	H. H. H. H.
Bromeliaceae: Amaryllidaceae:	<i>Billbergia Liboniana</i> <i>Leukoium vernum</i> <i>Agave americana</i> <i>Clivia spec.</i> <i>Iris graminea</i> - <i>pallida</i> <i>Gladiolus communis</i>	Blatt, Zwiebel " " Rhizom Zwiebel	+ + + + + + +	- - - - Einzelne Zellen im Gefäßbündel, Mesophyll u. in der Epidermis + Wie <i>I. graminea</i> , nur schwächer + - Im Zentralzylinder zahlreiche typische Inklusen, die sofort + sind. Die Zwiebelhaut enthält auch typische In- klusen, doch tritt die Eisenchlorid- reaktion wie die Rotfärbung erst nach Stunden ein. Im Gefäßbündel einzelne Zellen +	fr. H. fr. fr. H. H.
Cyperales: Cyperaceae:	<i>Carex atrata</i> - <i>cyperoides</i> - <i>brizoides</i> <i>Eriophorum vaginatum</i> <i>Cyperus alternifolius</i>	Blatt Rhizom, Wurzel, Blatt, Schaft Blatt, Schaft " Schaft	+ - - schwach + " +	- - - - Im Gefäßbündel Zellen, diffus + im Grundgewebe vereinzelt Zellen +	H. H. H. H. fr.

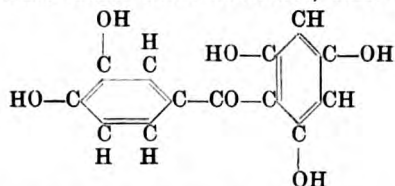
der Phloroglucinderivate und der Inklusen zu lösen war, wurden Vertreter aus allen Pflanzenstämmen untersucht. An Stelle der Lindtschen Vanillin-Salzsäure wurde p-Dimethylaminobenzaldehyd in schwefelsaurer Lösung von bestimmter Konzentration für den Nachweis des Phloroglucins und seiner Verbindungen herangezogen. Zur Herstellung des Reagens werden 0,5 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 8,5 g konzentrierter Schwefelsäure gelöst und darauf 8,5 g Wasser zugesetzt. Das Reagens wird am besten in einem braunen Gläschen aufbewahrt. Bei der Verwendung genügt 1 Tropfen, in den man das zu untersuchende Präparat bringt, um bei positiver Reaktion sofort eine leuchtend rote Farbe wahrzunehmen. Das genannte Reagens erwies sich als bedeutend empfindlicher und gestattet eine bessere Lokalisation als die Vanillin-Salzsäure. Sein reaktionelles Verhalten gleicht aber im wesentlichen derselben. Phloroglucin und die meisten seiner Derivate färben sich mit dem Reagens sogleich tief rot, oder es fällt, wenn sie sich in Lösung befinden, ein roter Niederschlag aus.

Bei der Prüfung der reinen Verbindungen mit dem Reagens stellte sich heraus, daß nicht alle Phloroglucinderivate unter Farbenänderung reagieren. So ist beim Hesperidin und Hesperetin jede Reaktion zu vermissen, beim Phloridzin tritt sie sehr langsam ein, wahrscheinlich in dem Maße, als Phloretin frei wird; auch bei Filicin ist keine Rotfärbung wahrzunehmen. Dagegen tritt bei Catechin die gleiche Farbenreaktion ein, ohne daß sie sich irgendwie von der Phloroglucinfärbung unterscheidet. Durch die Tatsache, daß bei der Kalischmelze des Catechins sich Phloroglucin und Protocatechusäure bilden, ist übrigens die Beziehung zum Phloroglucin gegeben. Interessant ist ferner, daß Maclurin, das bei der Kalischmelze gleichfalls Phloroglucin und Protocatechusäure liefert, mit den beiden Aldehydreagenzien keine Farbenreaktion gibt. Erst im Verlaufe von ein paar Stunden entwickelt sich eine schwache gelbrötliche Färbung. In der Wärme freilich entsteht beim Erhitzen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd eine Rotfärbung. Diese ist aber auf Rechnung des Phloroglucins zu setzen, das bekanntlich beim Erhitzen des Maclurins mit verdünnter Schwefelsäure auf 120° abgespalten wird. Der

reaktionelle Unterschied des Catechins und Maclurins gegenüber D. und V. fällt um so mehr auf, wenn man die Konstitution der beiden Verbindungen in Betracht zieht. Dem Catechin wird bekanntlich folgende Formulierung zugeschrieben:



Man könnte dann beim Maclurin, falls man die Reaktion



auf den Phloroglucinrest im Molekül zurückführt, bei Vergleich der beiden Formelbilder um so eher eine Rotfärbung erwarten, da ja hier der Phloroglucinrest vollständig erhalten ist. Von den übrigen durchgeprüften Verbindungen, wobei die Untersuchung ihr Augenmerk vorwiegend den in den Pflanzen vorkommenden Stoffen zuwandte, reagierten nur noch Resorcin und Orcin unter Farbenänderung und ähnlich wie Phloroglucin. Doch sind in beiden Fällen die erzielten Farbentöne andere, und die Reaktion tritt eindeutig später ein.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen ist nach dem Angeführten eine in der Kälte im Pflanzengewebe mit D. sofort auftretende Rotfärbung auf Phloroglucin oder Catechin-derivate zu beziehen. Nur pflanzliche Farbstoffe können zu Täuschungen Anlaß bieten, aber auch hier wohl nur in dem Falle, wenn mit Exsiccatenmaterial gearbeitet wird und der veränderte Farbstoff bei Zusatz des Reagens wieder regeneriert wird. Eine Kontrollprobe mit verdünnter (50%) Schwefelsäure allein, die in allen untersuchten Fällen vorgenommen wurde, schützt vor Verwechslung. Was nun das Catechin betrifft, so wurde bis jetzt bei der Deutung der in den Pflanzen mit Vanillin-Salzsäure erfolgenden Rotfärbung die Möglichkeit, daß die Reaktion durch Catechin bedingt sein könnte, nicht weiter berücksichtigt. Die Rotfärbung der Inklusen auf Zusatz

des Lindtschen Reagens wurde in der Literatur immer auf Phloroglucotannoide bezogen, trotzdem Phloroglucin und Catechin sich durch die gewählte Reaktion nicht auseinanderhalten lassen. Obwohl man dem Vorkommen von Catechin in den Pflanzen bis nun wenig Aufmerksamkeit geschenkt hat, sind doch aus makrochemischen Untersuchungen mehrere Pflanzen bekannt, in denen es sogar in reichlichen Mengen vorkommt. Hierher zählen vor allem Catechu und Kino liefernde Pflanzen, wie *Acacia catechu*, *Eucalyptus*-Arten, *Uncaria Gambir*, dann *Anacardium occidentale* (Holz), *Swietenia Mahagoni* (Holz), *Salix fragilis* und gewisse Chinarinden. Die genannten Pflanzen zeigen mit D. starke Rotfärbung. Es ist sicher, daß die Reaktion mindestens zum Teil durch Catechin bedingt ist, und ebenso wird man zweifellos bei genauerem Forschen noch eine größere Anzahl Catechin führender Pflanzen auffinden.

Nach den durchgeführten Versuchen zeigt demnach die Rotfärbung nur Phloroglucin- und Catechin-derivate an, wobei freilich der negative Ausfall der Reaktion nicht auch schon das vollständige Fehlen von Phloroglucinderivaten einschließt, wie aus dem Beispiel des Hesperidins hervorgeht. *Citrus Aurantium*, *Conium* oder *Hyssopus*, in denen es reichlich vorkommt, geben mit D. keine Rotfärbung.

Bei der Auswahl des Pflanzenmaterials mußte dem Umstande Rechnung getragen werden, daß wir durch die Untersuchungen v. Höhnels, Weinzierls und Waages über das Vorkommen der mit Vanillin-Salzsäure bzw. Anilin- oder Toluidinnitrat und Alkalinitrit sich färbenden Inhaltsstoffe bei den Filicinae und den Anthophyta ziemlich unterrichtet sind, daß aber analoge Untersuchungen für die Thallophyta und Bryophyta vollständig fehlen. Daher wurden die Thallophyta besonders berücksichtigt. Es zeigte sich, daß mit D. nachweisbare Phloroglucin- oder Catechinverbindungen in den ersten 6 Pflanzenstämmen anscheinend nicht auftreten, wenigstens wurde bei keiner der untersuchten Pflanzen aus den Myxo-, Schizo-, Zygo-, Phaeo-, Rhodo- und Euthallophyten auch nur die Andeutung einer Reaktion erhalten. Bei den Cormophyten sind es erst die Pteridophyten, die sich mit D. rot färben. Es ist von Interesse,

daß auch die Ligninreaktion erst bei den Pteridophyten auftritt¹⁾. In den Gymnospermen sind Phloroglucin oder Catechinverbindungen reichlich vorhanden, wenig unter den Monocotylen. Bei den Dicotylen sind bestimmte Familien durch starke Rotfärbung ausgezeichnet, während bei anderen eine solche durchwegs vermißt wird. Bei vielen Familien zeigen die einen Pflanzen Rotfärbung, die anderen nicht. Interessant ist hier das Verhalten der Orchidaceen. Soweit sie untersucht wurden, konnten keine mit D. reagierenden Phloroglucin- oder Catechinverbindungen gefunden werden. Nur die *Maxillaria densa* zeigte starke Rotfärbung und schöne Inklusionbildung in den Blättern; die Inklusionen werden allerdings mit Kalilauge nicht blau, sondern gelb-rötlich.

Die bei den Cormophyten erzielten Untersuchungsergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den von Waage gefundenen. Unter Zuhilfenahme seiner Arbeit, der von v. Höhnel und von Weinzierl läßt sich vorläufig folgende Übersicht aufstellen:

Phloroglucin- oder catechinreich sind zu bezeichnen: Filices, Coniferae, Betulaceae, Fagaceae, Juglandaceae, Salicaceae, Ulmaceae, Polygonaceae, Hamamelidaceae, Platanaceae, Lauraceae, Theaceae, Tiliaceae, Geraniaceae, Aceraceae, Hippocastanaceae, Crassulaceae, Saxifragaceae, Rosaceae, Leguminosae, Myrtaceae, Primulaceae, Caprifoliaceae, Palmae. Die meisten Arten enthalten die fraglichen Substanzen in großen Mengen.

Phloroglucin- oder catechinarm oder -frei sind: Bryophyta, Lycopodinae, Equisetinae, Urticaceae, Piperaceae, Chenopodiaceae, Ranunculaceae, Caryophyllaceae, Cruciferae, Umbelliferae, Rutaceae, Solanaceae, Labiatae, Scrophulariaceae, Oleaceae, Dipsacaceae, Compositae, Monokotyledones mit Ausnahme der Palmae, Araceae und Liliaceae.

Es sind in beiden Gruppen nur jene Familien aufgenommen worden, bei denen eine genügende Anzahl von Arten untersucht wurde.

Doch muß noch auf einen Umstand hingewiesen werden,

¹⁾ Molisch, Mikrochemie der Pflanze, G. Fischer, Jena 1913, S. 308.

der Unterschiede in den Prüfungsergebnissen verschiedener Untersucher verursachen könnte. Bei der Anstellung der Reaktion ist nämlich das Alter der betreffenden Pflanzenorgane, ob sie lebend oder konserviert zur Untersuchung gelangen und auch die Jahreszeit, zu der sie gesammelt werden, für den Ausfall der Reaktion von Bedeutung. Ein einfacher kleiner Versuch rückt diese Tatsache dem Verständnis näher, ohne daß damit ausgesagt werden soll, daß die gleichen Prozesse in der Pflanze die Änderung der Reaktion auslösen. Zum Teil tun sie es sicher. Stellt man sich aus Pegucatechu Catechugerbsäure durch Lösen in Wasser und Fällen mit starker Säure dar, so färbt sich die frisch gefällte, noch feuchte Gerbsäure mit D. sofort schön rot; anhaltend getrocknet (mineralsäurefrei), verliert sie das Vermögen, sich zu färben, vollständig. Erst nach längerem Erwärmen mit D. ist wieder eine Rotfärbung zu beobachten.

Bei den meisten untersuchten Pflanzen wurde ferner auf Gerbstoff geprüft. In allen Fällen, in denen mit D. Rotfärbung eintrat, konnte Gerbstoff nachgewiesen werden, und zwar in denselben Zellen und außerdem sehr häufig auch in anderen. Aber auch in vielen phloroglucin- und catechinfreien Pflanzenfamilien sind Gerbstoffe vorhanden, manchmal sogar in großen Mengen. Diese Tatsache steht in Übereinstimmung mit den Erfahrungen der Gerbstoffchemiker, die verschiedene Gruppen von Gerbstoffen aufstellen. So gibt die Gruppe der Gerbstoffe, die sich von Abkömmlingen der Dioxyzimtsäure ableitet, sowie diese selbst (s. oben) mit D. keine Reaktion.

Eines wäre hier noch hervorzuheben. Das schon vorhin angezogene Beispiel der Hesperidinpflanzen läßt die Annahme zu, daß die Entstehung der Phloroglucinderivate sicherlich nicht einheitlicher Natur ist und die Verbindungen auch von verschiedener biologischer Bedeutung sind. Über die Verteilung der Phloroglucin- und Catechinverbindungen in den Organen und Geweben der Pflanzen ist den aus der Literatur bekannten Verhältnissen nichts hinzuzufügen. Die am untersuchten Material gesammelten Erfahrungen decken sich vollständig mit den sonst angegebenen. Im allgemeinen stehen die erwähnten

Verbindungen den Gerbstoffen sehr nahe oder sind mit ihnen identisch.

Was schließlich die Inklusen anbelangt, so wurde eingangs die heute festgelegte Begriffsdefinition gegeben, und es wurde darauf verwiesen, daß nach Molisch die Gerbstoffvakuolen mit den Inklusen entwicklungsgeschichtlich nahe verwandt, ja identisch sind. Die durchgeführten Untersuchungen haben diese Annahme im weitesten Umfang bestätigt. Sehr schön lassen sich diese Verhältnisse an der schon erwähnten *Maxillaria densa* studieren. Alle Stadien von der kleinsten Gerbstoffvakuole bis zur ausgebildeten Inkluse sind hier zu verfolgen. Doch scheint eine weitere Fassung des Begriffes Inkluse notwendig. Zunächst dahin, daß nicht Phloroglucotannoide vorhanden sein müssen, sondern auch Tannoide mit Catechinderivaten die gleiche Rolle spielen; konnten doch diese heute mikrochemisch, vorläufig wenigstens, nicht auseinandergehalten werden. Dann muß das Kriterium des Nachweises durch V. oder D. entfallen. Denn bei derselben Pflanze sieht man auf verschiedenen Altersstufen die Reaktion stärker oder schwächer oder gar nicht auftreten. Es sei auf *Gladiolus* verwiesen. Während im Parenchym des Knollens Inklusen mit sofort auftretender Rotfärbung zu finden sind, verhalten sich die sehr schönen und zahlreichen Inklusen der Knollenhaut D. gegenüber sehr träge. Ganz allmählich, etwas rascher beim Erwärmen, bei einigen Inklusen überhaupt nicht, erfolgt schwache Rotfärbung. Die Erklärung ist wohl die, daß in der trockenen Haut Kondensationsprozesse vor sich gegangen sind, etwa solche, wie sie der Versuch mit der Catechugersäure versinnbildlicht. Daß in gleicher Weise das Verhalten der Inklusen bei Behandlung mit Eisensalzen sich ändert, wie schließlich auch die Löslichkeit, ist nur selbstverständlich. Wo ist dann aber die Grenze zu ziehen gegenüber Inklusen, die andere Gerbstoffe enthalten? Man könnte sie nach dem Gesagten unmittelbar wenigstens nicht erkennen. Auch die Feststellung, ob die Grundsubstanz bassorinartig ist oder ob nicht eine reichlich mit Gerbstoffen angefüllte, kleinere oder größere, sozusagen eingedickte Vakuole vorliegt, dürfte nicht leicht fallen. Es wäre demnach der Begriff Inkluse in dem ausgeführten Sinne zu vervollständigen.

Nach dem Stande der heutigen Kenntnisse läßt sich über die Bedeutung und Funktion der Inkluden nichts Bestimmtes aussagen. Auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen gewähren keinen Einblick in die Biologie der Inkluden. Es war ja auch, wie die anfangs gegebene Fragestellung zeigt, nur beabsichtigt, mit Hilfe eines neuen Reagens Phloroglucin, Catechin und ihre Derivate nachzuweisen, sowie ihre Verbreitung im Pflanzenreiche zu verfolgen.

IV.

Zusammenfassung.

I. p-Dimethylaminobenzaldehyd, in Schwefelsäure gelöst, wurde als Reagens für Phloroglucin verwendet, da er eine raschere und besser lokalisierte Reaktion ermöglicht als das Lindtsche Reagens, außerdem den Vorzug der Haltbarkeit besitzt.

II. Mit diesem Reagens wurden 464 Pflanzen aus allen Pflanzenstämmen untersucht und folgendes Resultat erhalten: Die ersten 6 Pflanzenstämme geben keine Reaktion. Im 7. Stamm tritt die Reaktion erst bei den Pteridophyten auf. Stark reagieren folgende Familien: Filices, Coniferae, Betulaceae, Fagaceae, Juglandaceae, Salicaceae, Ulmaceae, Polygonaceae, Hamamelidaceae, Platanaceae, Lauraceae, Theaceae, Tiliaceae, Geraniaceae, Aceraceae, Hippocastanaceae, Crassulaceae, Saxifragaceae, Rosaceae, Leguminosae, Myrtaceae, Primulaceae, Caprifoliaceae, Palmae. Schwach oder gar nicht reagieren die Bryophyta, Lycopodinae, Equisetinae, Urticaceae, Piperaceae, Chenopodiaceae, Ranunculaceae, Caryophyllaceae, Cruciferae, Umbelliferae, Rutaceae, Solanaceae, Labiatae, Scrophulariaceae, Oleaceae, Dipsaceae, Compositae, Monokotyledones mit Ausnahme der Palmae, Araceae und Liliaceae.

III. Catechin reagiert ebenso wie Phloroglucin. Auf Grund makrochemischer Analysen ist anzunehmen, daß die bei vielen Pflanzen auftretende Rotfärbung zum Teil wenigstens auf Catechin zurückzuführen ist.

Zum Schlusse nehme ich die Gelegenheit wahr, Herrn Professor Dr. H. Molisch und Herrn Privatdozenten Dr. R. Wasicky für die zahlreichen Anregungen und Ratschläge bestens zu danken.

Weitere Versuche über die Trockensubstanzvermehrung der Hefe unter Anwendung von Harnstoff als Stickstoffquelle.

Von

Th. Bokorny.

(Eingegangen am 21. April 1917.)

Bessere Resultate als früher (diese Zeitschr. 1917) hoffte ich durch Anwendung geringerer Temperaturen als 20 bis 25° zu erhalten. Denn schon neulich schienen mir einige Parallelversuche darauf hinzuweisen, daß die niedrigere Temperatur von 15° günstiger für die Vermehrung der Hefe in gärfähigen Nährlösungen sei, als 20 bis 25°. Der Antagonismus zwischen Gärung und Ernährung, welcher bei 20 bis 25° durch zu starke Begünstigung des Gärvorganges dahin führt, daß gar keine Trockensubstanzvermehrung trotz Anwesenheit bester Nährstoffe erfolgt, wird durch niedrigere Temperaturen zugunsten des Ernährungsvorganges gewendet. Es findet dann zwar keine Vermehrung der Ernährung, wohl aber eine Verminderung des Gärungsprozesses statt, so daß mehr Zucker als Hefezellbestandteil angesetzt wird. Auch in der Bierbrauerei, aus der die meiste Abfallhefe des Handels stammt, wird eine niedere Temperatur eingehalten. Das Resultat ist eine Vermehrung der Hefe aufs Vielfache.

Fürs Zweite setzte ich Hoffnung auf den Luftzutritt zu der Hefe, während des Gärungs- und Ernährungsvorganges.

Leider erwiesen sich meine Vorrichtungen vorläufig nicht als ausreichend.

Ich brachte 0,02 g Preßhefe in folgende Gär- und Nährlösung:

Harn (aufs 5fache verdünnt) 25 ccm
Rohrzucker (reinst) 2 g

Die Lösung wurde auf Filtrierpapier gegossen, das zur Auskleidung einer geräumigen Glasschale mit 4 l Inhalt verwendet war. Die Schale war mit übergreifendem Deckel geschlossen.

Schon nach wenigen Tagen machte sich ein säuerlich-ranziger Geruch bemerkbar, der mir die Verunreinigung der ausgesäten wachsenden Hefe mit Bakterien anzeigte. Auch Schimmelpilze stellten sich ein.

Somit kann man bei diesem Verfahren keine Hefeaufzucht herstellen. Die Hefe wird bald überwuchert von andern Pilzen. Andere Versuche bei Luftzutritt siehe später.

Weiterhin wollte ich noch den Unterschied zwischen neutralisiertem und nicht neutralisiertem Harn prüfen. Möglicherweise gibt ein neutralisierter Harn besseres Resultat als ein nicht neutralisierter (beide unter Zuckerezusatz).

Endlich schien es mir vielleicht vorteilhaft zu sein, den Harn nicht so stark zu verdünnen, wie es in den neulichen Versuchen geschah (er wurde bis aufs 5fache mit Wasser verdünnt). Besonders der neutralisierte Harn schien mir auch in konzentrierterer Lösung anwendbar zu sein.

Ferner machte ich noch einige Versuche unter Sauerstoffzufuhr.

Versuche mit neutralisiertem und nicht neutralisiertem Harn bei verschiedenen Verdünnungen.

Die Preßhefe hatte 30⁰/₀ Trockensubstanz; sie wurde zu 0,02 g überall zugesetzt.

Die Temperatur betrug bei Versuch 1 bis 9 15⁰.

Zur Neutralisation wurde Dikaliumphosphat angewendet.

Versuch 1.

Harn unverdünnt und nicht neutralisiert	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Brennereipreßhefe (aus Karlsruhe) Temperatur 15 ⁰	0,02 "

Nach 4 Wochen ergab die Trockensubstanzbestimmung 0,05 g Trockenhefe gegen 0,006 ursprünglich. Die Trockensubstanzvermehrung betrug also 733,3⁰/₀.

Versuch 2.

Harn unverdünnt und mit $\text{PO}_4\text{K}_3\text{H}$ neutralisiert 25 ccm
 Rohrzucker (reinst) 2 g
 Brennereipreßhefe, Temperatur 15° 0,02 "

Die Trockensubstanz der Hefe betrug nach 4 Wochen 0,10 g gegen 0,006 g ursprünglich. Somit war eine Trockensubstanzvermehrung um $1566,6\%$ eingetreten. Die Neutralisierung hatte also offenbar vorteilhaft gewirkt.

Versuch 3.

Harn unverdünnt, nicht ganz neutralisiert . . 25 ccm
 Rohrzucker (reinst) 2 g
 Brennereipreßhefe, Temperatur 15° 0,02 "

Hier erhielt ich nach 4 Wochen 0,06 g Trockensubstanz. Somit betrug die Trockensubstanzvermehrung in diesem Falle 900% . Sie war geringer als bei vollständiger Neutralisierung und größer als ohne Neutralisierung des Harns.

Versuch 4.

Harn nicht neutralisiert, aufs Doppelte mit
 Brunnenwasser gebracht 25 ccm
 Rohrzucker (reinst) 2 g
 Brennereipreßhefe, Temperatur 15° 0,02 "

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 4 Wochen 0,050 g gegen 0,006 anfänglich. Die Trockensubstanzvermehrung berechnet sich hier auf $733,3\%$, also gleich mit Versuch 1, wo der Harn unverdünnt gelassen und ebenfalls nicht neutralisiert war.

Versuch 5.

Harn mit $\text{PO}_4\text{K}_3\text{H}$ neutralisiert, dann mit Brunnen-
 wasser aufs Doppelte verdünnt 25 ccm
 Rohrzucker (reinst) 2 g
 Brennereipreßhefe, Temperatur 15° 0,02 "

Nach 4 Wochen ergab sich 0,055 g Trockensubstanz gegen 0,006 anfänglich. Somit war die Trockensubstanz um $816,6\%$ gewachsen.

Die Vermehrung der Trockensubstanz war demnach etwas größer als im nicht neutralisierten Nährstoffgemische, aber nicht so groß wie bei dem entsprechenden Versuch mit unverdünntem Gemische.

Der Zusatz von Wasser scheint also bei neutralisiertem Harn die Ausbeute etwas zu vermindern, soweit aus diesem einen Versuch schon ein Schluß gezogen werden darf.

Versuch 6.

Harn, nicht neutralisiert, mit Brunnenwasser aufs

3fache verdünnt	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Brennereipreßhefe, Temperatur 15°	0,02 "

Nach 4 Wochen ergab die Trockensubstanzbestimmung 0,030 g gegen 0,0066 g anfänglich.

Somit berechnet sich die Trockensubstanzvermehrung hier auf 354,5⁰/₀.

Infolge der stärkeren Verdünnung war die Vermehrungsziffer beträchtlich zurückgegangen.

Versuch 7.

Harn mit PO₄K₂H neutralisiert, dann mit Brunnen-

wasser aufs 3fache verdünnt	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Brennereipreßhefe, Temperatur 15°	0,02 "

Als nach 4 Wochen die Trockensubstanzbestimmung gemacht wurde, ergab sich 0,032 g Trockensubstanz.

Das macht eine Trockensubstanzvermehrung um 384,8⁰/₀.

Infolge der Neutralisierung war das Vermehrungsergebnis um ein wenig günstiger wie bei 6.

Aber beträchtlich blieb dasselbe zurück gegenüber der Vermehrung bei den entsprechenden Versuchen mit unverdünntem und nur aufs Doppelte verdünntem Harn.

Versuch 8.

Harn nicht neutralisiert, aufs 5fache mit Brun-

nenwasser verdünnt	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Brennereipreßhefe, Temperatur 15°	0,02 "

Nach 4 Wochen ergab die Trockensubstanzbestimmung 0,025 g.

Die Trockensubstanzvermehrung, die hier eintrat, bei 5fach verdünntem Harn, berechnet sich auf 274,2 ‰.

Somit fand hier infolge der starken Verdünnung ein noch größerer Rückgang in der Trockensubstanzvermehrung statt als bei nur 3facher Verdünnung.

Der Mangel der Neutralisation dürfte hier kaum mehr einen Einfluß haben.

Versuch 9.

Harn mit $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ neutralisiert, dann mit Brunnenwasser aufs 5fache verdünnt 25 ccm
Rohrzucker (reinst) 2 g
Brennereipreßhefe, Temperatur 15° 0,02 "
Trockensubstanz nach 4 Wochen 0,025 g.

Hieraus berechnet sich wiederum eine Trockensubstanzvermehrung um 274,2 ‰, also völlig gleich mit dem entsprechenden Versuch an nicht neutralisiertem Harn (Versuch 8).

Im großen und ganzen können wir aus dieser Versuchsreihe entnehmen, daß der neutralisierte Harn besser wirkt als der nicht neutralisierte, wobei aber zu bemerken ist, daß der Unterschied abnimmt, sobald eine Verdünnung des Harns vorgenommen wird; schon bei 5facher Verdünnung schien derselbe gänzlich zu schwinden.

Die Verdünnung des Harns erwies sich ceteris paribus bis zu einem gewissen Grad schädlich, jedenfalls weil die Nährstoffe nicht mehr so reichlich zur Verfügung stehen. Völlig unverdünnter Harn sollte immer neutralisiert werden.

Versuche bei 12° mit Harn als N-Quelle.

Versuch 10.

Harn (aufs 5fache verdünnt, nicht neutralisiert) 25 ccm
Rohrzucker (reinst) 2 g
Hefe (Brennereipreßhefe) 0,02 g (von 30‰ Trockensubstanz),
Temperatur 12°.

Nach 4 Wochen war noch nicht aller Zucker vergoren. Die Trockensubstanzbestimmung ergab nun 0,035 g.

Somit war eine Trockensubstanzvermehrung um 430,3⁰/₀ eingetreten.

Da die Vermehrung bei dem entsprechenden Versuch der vorigen Versuchsreihe nur 274,2⁰/₀ betrug, so scheint die um 3⁰ niederere Temperatur günstig gewirkt zu haben.

Vermutlich wurde durch die niedrigere Temperatur der Gärvorgang stärker zurückgehalten, während die Vermehrung der Hefe doch noch genügend fortschritt.

Versuch 11.

Harn (aufs 5fache, mit PO ₄ K ₃ H neutralisiert)	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Hefe (Brennereipreßhefe)	0,02 g
Temperatur 12 ⁰ .	

Auch hier war nach 4 Wochen noch Zucker vorhanden. Die Trockensubstanzbestimmung ergab nun 0,040 g. Zucker noch nicht ganz vergoren.

Das macht eine Trockensubstanzvermehrung um 506,6⁰/₀.

Die Neutralisation schien noch in geringem Grade günstig zu wirken.

Jedenfalls hatte die Temperaturerniedrigung um 3⁰ gegenüber dem sonst gleichen Versuche 9 zu einem positiven Ausschlage geführt. Die Trockensubstanzvermehrung war größer als bei 9.

Da der Zucker bei der vierwöchentlichen Versuchszeit nicht ganz vergoren war, so wird die verlangsamte Gärung günstig auf die Vermehrung gewirkt haben.

Versuch 12.

Harn (aufs 3fache, nicht neutralisiert)	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Hefe (Brennereipreßhefe)	0,02 "
Temperatur 12 ⁰ .	

Nach 4 Wochen ergab die Trockensubstanzbestimmung 0,040 g. Der Zucker war auch hier unvollständig vergoren.

Hieraus berechnet sich die Trockensubstanzvermehrung zu 506,6 ‰.

Durch die geringere Verdünnung des Harns ist die Trockensubstanzvermehrung um etwas gegenüber dem sonst gleichen Versuche 10 angestiegen.

Versuch 13.

Harn (aufs 3fache, mit $\text{PO}_4\text{K}_3\text{H}$ neutralisiert)	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Hefe (Brennereipreßhefe)	0,02 "
Temperatur 12°.	

Als nach 4 Wochen die Trockensubstanzbestimmung gemacht wurde, ergab sich 0,050 g. Zucker auch hier unvollständig vergoren.

Die Trockensubstanzvermehrung berechnet sich auf 657,8 ‰.

Gegenüber dem Parallelversuch 6 (mit 15° Temperatur) ist die Trockensubstanzvermehrung nahezu um das Doppelte größer.

Es zeigt sich also hier die günstige Wirkung niederer Temperatur auf die Trockensubstanzvermehrung der Hefe recht deutlich. Die Vergärung des Zuckers war aufgehalten, infolgedessen konnte mehr Zucker zur Ernährung der Hefe gebraucht werden.

Versuch 14.

Harn (aufs Doppelte verdünnt, nicht neutralisiert)	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Hefe (Brennereipreßhefe)	0,02 g
Temperatur 12°.	

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 4 Wochen 0,040 g gegen 0,0066 g ursprünglich.

Die Trockensubstanz war also um 506,6 ‰ gewachsen.

Gegenüber dem Versuch 12 mit 3facher Verdünnung des Harns zeigte sich keine Zunahme der Vermehrung.

Im Vergleich mit Versuch 4, der bei 15° aufgestellt, sonst gleich war, ergab sich sogar eine Abnahme der Vermehrung.

Versuch 15.

Harn (aufs Doppelte verdünnt, neutralisiert) 25 ccm
 Rohrzucker (reinst) 2 g
 Hefe (Brennereipreßhefe) 0,02 g
 Temperatur 12°.

Nach 4 Wochen ergab die Trockensubstanzbestimmung 0,045 g gegen 0,0066 g ursprünglich.

Somit hatte die Hefetrockensubstanz um 581,8% zugenommen.

Gegenüber dem Versuch 13, der aufs 3fache verdünnten Harn enthielt, ergab sich somit eine kleine Abnahme der Trockensubstanzvermehrung.

Im Vergleich mit dem bei 15° aufgestellten sonst gleichen Versuch 5 ergab sich wiederum eine Abnahme.

Versuch 16.

Harn (unverdünnt, nicht neutralisiert) 25 ccm
 Rohrzucker (reinst) 2 g
 Hefe (Brennereipreßhefe) 0,02 g
 Temperatur 12°.

Nach 4 Wochen 0,040 g Trockensubstanz, gegen 0,0066 g Trockensubstanz anfänglich.

Die Hefetrockensubstanz hatte also um 506,6% zugenommen.

Gegen Versuch 14 mit doppelt verdünntem Harn keine Besserung.

Gegenüber dem Versuch 1, der bei 15° aufgestellt war, bedeutet dies eine Verschlechterung.

Woran mag das liegen? Vielleicht war die Hefe nicht mehr so vermehrungsfähig.

Versuch 17.

Harn (unverdünnt, neutralisiert) 25 ccm
 Rohrzucker (reinst) 2 g
 Hefe (Brennereipreßhefe) 0,02 g
 Temperatur 12°.

0,050 g Trockensubstanz nach 4 Wochen gegen 0,0066 g ursprünglich.

Die Hefetrockensubstanz hatte also um 657,5 % zugenommen.

Mit Versuch 15 verglichen, der aufs Doppelte verdünnten Harn enthielt, eine kleine Besserung!

Gegen Versuch 2, der bei 12° aufgestellt war, eine bedeutende Verschlechterung.

Auch hier scheint mir die Hefe nicht mehr so gut gewesen zu sein.

Es spielen eben bei physiologischen Versuchen recht viele Dinge mit.

So das Liegen der Preßhefe (die Versuche 14 bis 17 waren einen Tag später aufgestellt worden als die Vergleichsversuche).

Nun bemerkte man an Preßhefe häufig schon nach einem Tage durch den veränderten Geruch, daß dieselbe nicht mehr so gut sei wie ursprünglich.

Es kommen Bakterien auf, die durch ihre giftigen Produkte die Vermehrung der Hefe beeinträchtigen.

In den folgenden Versuchen 18 bis 25 wurde der Harn mit $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ neutralisiert (wenn „neutralisiert“ angegeben). Salpeter, Ammoniak und Pepton wurden zum Vergleich herangezogen.

Temperatur 20 bis 25°.

Versuch 18 (nur Harnstickstoff).

Hefe (Brennereipreßhefe) . . . 0,02 g (m. 30 % Trockensubst.)

Harn, aufs Doppelte verdünnt,

nicht neutralisiert . . . 25 ccm

Rohrzucker (reinst, großkrystall.) 2 g (d. i. 8 %)

Temperatur 20 bis 25°.

Es trat binnen 24 Stunden lebhafte Gärung ein.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 4 Tagen 0,073 g gegen 0,0066 g ursprünglich.

Die Trockensubstanzvermehrung betrug also 1008 %.

Versuch 19 (Harn- und Salpeterstickstoff).

Hefe (Brennereipreßhefe) . . .	0,02 g (m. 30 ⁰ / ₀ Trockensubst.)
Harn, aufs Doppelte verdünnt, nicht neutralisiert . . .	25 ccm
Kaliumsalpeter	0,05 g (d. i. 0,2 ⁰ / ₀)
Rohrzucker(reinst, großkrystall.)	2 g
Temperatur	20 bis 25 ⁰ .

Nach 24 Stunden war lebhafte Gärung eingetreten.

Hier ergab die Trockensubstanzbestimmung nach 4 Tagen 0,074 g gegen 0,0066 g ursprünglich.

Die Trockensubstanzvermehrung betrug demnach 1021⁰/₀.

Versuch 20 (nur Salpeter als N-Nahrung).

Hefe (Brennereipreßhefe)	0,02 g
Kaliumsalpeter	0,05 " (d. i. 9,2 ⁰ / ₀)
Monokaliphosphat	0,0125 g (d. i. 0,05 ⁰ / ₀)
Magnesiumsulfat	0,005 " (" " 0,02 ⁰ / ₀)
Brunnenwasser	25 ccm
Rohrzucker (reinst, groß krystallisiert)	2 g
Temperatur	20 bis 25 ⁰ .

Nach 12 Stunden war noch keine Gärung zu bemerken, während die gleichzeitig aufgestellten Versuche (18, 19, 21, 22, 23, 24, 25) Kohlensäureentwicklung zeigten. Ebenso nach 48 Stunden. Nach 72 Stunden etwas Gärung da.

Nach 4 Tagen sah ich fast keine Hefe. Die Trockensubstanz konnte darum nicht bestimmt werden, soviel wie 0,00.

Versuch 21 (nur Harnstickstoff).

Hefe (Brennereipreßhefe)	0,02 g
Harn, aufs Doppelte verdünnt, neutralisiert	25 ccm
Rohrzucker (reinst, groß krystallisiert) . . .	2,00 g
Temperatur	20 bis 25 ⁰ .

Nach 24 Stunden war Gärung eingetreten.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 4 Tagen 0,093 g gegen 0,0066 g ursprünglich.

Die Trockensubstanzvermehrung betrug somit 1309⁰/₀!

Versuch 22 (Harnstickstoff und Salpeter).

Hefe (Brennereipreßhefe) 0,02 g
Harn, aufs Doppelte verd., neutralisiert 25 ccm
Rohrzucker (reinst) 2 g
K-Salpeter 0,05 g (d. i. 0,2%)
Temperatur 20 bis 25°.

Nach 24 Stunden war Gärung eingetreten.

Nach Ablauf von 4 Tagen ergab die Trockensubstanzbestimmung 0,090 g gegen 0,0066 g anfänglich.

Die Trockensubstanzvermehrung betrug somit 1264%!

Versuch 23 (Harnstickstoff und Salpeter).

Hefe (Brennereipreßhefe) 0,02 g
Harn, aufs 3fache verd., neutralisiert . . 25 ccm
Rohrzucker (reinst) 2 g
K-Salpeter 0,025 g (d. i. 0,1%).

Nach 24 Stunden war Gärung eingetreten.

Als nach 4 Tagen die Trockensubstanzbestimmung gemacht wurde, ergab sich 0,086 g gegen 0,0066 g anfängliche Tr.-S.

Somit war eine Trockensubstanzvermehrung um 1203% eingetreten.

Der 3fach verdünnte Harn liefert also ein ähnliches nur um wenig geringeres Resultat wie der nur aufs Doppelte verdünnte.

Versuch 24 (nur Ammoniak als N.-Quelle).

Hefe 0,02 g
Ammonsulfat 0,025 g (d. i. 0,01%)
Monokaliphosphat 0,0125 g (" " 0,05 ")
Magnesiumsulfat 0,005 g (" " 0,02 ")
Brunnenwasser 25 ccm
Rohrzucker (reinst, groß krystallisiert) . 2 g
Temperatur 20 bis 25°.

Nach 24 Stunden Gärung.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 4 Tagen 0,64 g.

Somit eine Trockensubstanzvermehrung von 869%.

Versuch 25 (Harn- und Ammoniakstickstoff).

Hefe	0,02 g
Harn, aufs Doppelte verdünnt, neutralisiert	25 ccm
Ammonsulfat	0,025 g (d. i. 0,1%)
Rohrzucker (reinst)	2 g.
Temperatur 20 bis 25°.	

Nach 24 Stunden Gärung.

Die Trockensubstanzbestimmung nach 4 Tagen ergab 0,110 g. Somit war eine Trockensubstanzvermehrung um 1567% eingetreten.

Aus den Versuchen 18 bis 25 geht folgendes hervor:

Ein Zusatz von Kaliumsalpeter (0,2%) zu mit 8% Zucker versetztem (aufs Doppelte verdünntem) Harn bessert kaum etwas an der Hefebausbeute (Versuch 18 und 19, dann 21 und 22). Offenbar wird der Harnstickstoff allein verwendet.

In Zuckerlösung von 8% Rohrzuckergehalt, welcher nur Kaliumsalpeter als Stickstoffquelle zugesetzt ist und die außerdem noch die nötigen Mineralsalze (Phosphat, K, Mg) enthält, wächst die Hefe nicht. Wahrscheinlich stirbt dieselbe bei dem Versuch, den Salpeter anzugreifen, durch das entstehende Nitrit ab. (Versuch 20.) Denn Nitrite sind für Hefe wie auch für viele andere Zellen sehr giftig.

Das Neutralisieren des doppelt verdünnten Harns mit $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ hat eine günstige Wirkung auf die Trockensubstanzvermehrung der Hefe. Man vergleiche dazu den Versuch 21 mit 18, 22 mit 19.

Der aufs 3fache verdünnte Harn liefert nur um wenig geringere Trockensubstanzvermehrung wie der aufs Doppelte verdünnte.

Den Harn noch weiter zu verdünnen, ist aber, wie ich aus vielen Versuchen schon früher ersehen habe, nicht mehr ratsam.

Ammonsulfat, für sich allein als Stickstoffquelle verwendet, liefert (mit 8% Rohrzucker und Mineralsalzen) kein so gutes Resultat, wie wenn man Harn und Ammonsulfat (0,1%) verwendet (Versuch 24 und 25) und auch kein so gutes wie Harn allein (Versuch 24 und 21).

Das Ammonsulfat ist ja schon längst von Naegeli und Loew als Stickstoffquelle bei Hefe und andern Pilzen erprobt worden, ebenso die organischen Amide.

O. Loew fand (1887), daß der Stickstoff aus allen Verbindungen angeeignet werden kann, die man als Amid oder Amin bezeichnet. Dabei ist es gleichgültig, ob der Kohlenstoff der Verbindung zur Ernährung verwendet werden kann oder nicht. Während Acetamid, Methylamin, Äthylamin, Propylamin, Asparagin, Leucin zugleich als Kohlenstoff- und als Stickstoffnahrung dienen, kann aus Oxamid und Harnstoff bloß N (nicht C) entnommen werden. Als Stickstoffquelle können die Pilze ferner alle Ammoniaksalze und einzelne derselben auch die salpetersauren Salze verwenden. Hierzu ist besonders zu bemerken, daß die Sproßpilze wohl durch Ammoniaksalze, nicht aber durch salpetersaure Salze ernährt werden können, während Schimmel- und Spaltpilze auch die Salpetersäure assimilieren können. Auf die Sproßhefe wirkt die Anwesenheit der Salpetersäure kaum günstiger, als wenn gar keine Stickstoffquelle vorhanden wäre, indem die eine Zeitlang vegetierende und sich fortpflanzende Sproßhefe zwar durch Bildung von Cellulose und Fett ihr Gesamtgewicht etwas vermehrt, den gesamten Stickstoffgehalt aber bedeutend vermindert. Ferner kann der freie Stickstoff von sämtlichen Pilzen (ausgenommen einige Bakterienarten) nicht assimiliert werden. Ebenso bleibt der Stickstoff im Cyan unverwertet, wenn Cyanverbindungen den Pilzen dargeboten werden.

Das sind die grundlegenden Tatsachen, die schon vor 35 Jahren von Naegeli und Loew festgestellt wurden. Wir ersehen daraus, daß die Pilze sich mit recht einfachen Stickstoffverbindungen begnügen können, werden aber auch auf merkwürdige Unterschiede aufmerksam und vor allzu voreiligen Verallgemeinerungen gewarnt. Insbesondere scheinen die Hefepilze in ihrer Nahrung wählerischer zu sein als andere Pilze. So kann der Stickstoff substituierter Ammoniak von Schimmel- und Spaltpilzen leicht assimiliert werden; ja ein Vergleich ergab, daß salzsaures Methylamin mit Zucker ein besseres Resultat lieferte als Salmiak mit Zucker. Hingegen ist z. B. Äthylamin für Sproßhefe nicht günstig; denn in einem Versuch verhielt sich die Zunahme bei salzsaurem Äthylamin und

Salmiak nahezu wie 1:2; bei ersterem traten auffallend rasch Spaltpilze auf. Der Grund für diese Unterschiede kann in verschiedenen Dingen liegen. Fürs erste kommt bei den salpetersauren Salzen das Reduktionsvermögen des zu ernährenden Organismus in Betracht. Denn eine Reduktion bis zu NH_3 muß zweifellos stattfinden, da die Eiweißstoffe bekanntlich den Stickstoff als NH_2 -Gruppe enthalten.

Die Nitrate erfahren nun durch Hefepilze keine Veränderung, während sie durch Bakterien verhältnismäßig rasch eine Reduktion zu Nitriten und (gleich nachher) zu Ammoniak erleiden. Um nur einen Versuch zu erwähnen, so ist bei der Durchleitung von von Ammoniak freigemachter Luft (mittels Hindurchleitens durch konz. Schwefelsäure) durch folgende Lösung: Dikaliumphosphat, 200 ccm Wasser, Dikaliumtartrat, Natriumnitrat, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, bald, indem Spaltpilze auftreten, eine nicht unbeträchtliche Reaktion auf salpetrige Säure mit Jodkaliumstärkekleister nach dem Ansäuern zu erhalten. Auch Ammoncarbonat findet sich in der Flüssigkeit ein. Demnach bilden die Bakterien aus Nitrat Ammoniaksalz. Dieses Vermögen geht nun der Sproßhefe ab, darum der negative Erfolg mit Nitrat. Im übrigen scheint das Vermögen, Nitrat zu NH_3 zu reduzieren, im Pflanzenreich weit verbreitet zu sein. Denn grüne Pflanzen können in der Regel sehr gut mit Nitraten ernährt werden (Salpeterdüngung). Weiterhin kommt auch, wenn man nicht Reinkulturen anwendet, der Konkurrenzkampf zwischen den Pilzen zur Geltung.

Im Anschluß an die obigen Versuche mit Ammonsulfat seien noch einige Versuche mit Pepton und Harn oder Pepton und Ammonsulfat, ferner Pepton + Harn + K-Salpeter erwähnt.

Sie enthielten mehrere N-Quellen nebeneinander.

Versuch 26

(Pepton als N-Quelle neben etwas Ammoniak).

Hefe (Brennereipreßhefe) . .	0,02 g
Pepton	0,05 g, d. i. 0,2 ^o / _o
Rohrzucker (reinst, großkry- stallisiert)	2 g
Ammonsulfat	0,025 g, d. i. 0,1 ^o / _o
Monokaliphosphat	0,00125 g, d. i. 0,5 ^o / _o

Magnesiumsulfat 0,00062 g, d. i. 0,025⁰/₀.

Es trat bald Gärung ein.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 4 Tagen 0,035 g.

Das macht eine Trockensubstanzvermehrung von 430⁰/₀ aus.

Versuch 27 (Harnstickstoff und Pepton).

Hefe

Harn (aufs Doppelte verd., mit
PO₄Na₂H neutral.) 25 ccm

Pepton 0,05 g, d. i. 0,2⁰/₀

Rohrzucker 2 g.

Nach 24 Stunden Gärung.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 4 Tagen 0,105 g.

Das bedeutet eine Trockensubstanzvermehrung um 1491⁰/₀.

Der Stickstoff als Pepton und Harn gegeben wirkt also vortrefflich; Pepton ist zugleich Kohlenstoffnahrung.

Versuch 28 (Harnstickstoff, Pepton und Salpeter).

Hefe 0,02 g

Harn (aufs Doppelte verd., mit
PO₄Na₂H neutral.) 25 ccm

Pepton 0,05 g, d. i. 0,2⁰/₀

K-Salpeter 0,05 g, d. i. 0,2⁰/₀.

Nach 24 Stunden Gärung.

Nach 4 Tagen ergab die Trockensubstanzbestimmung 0,055 g Trockensubstanz.

Das bedeutet eine Trockensubstanzvermehrung um 734⁰/₀ binnen 4 Tagen.

Pepton + Harn wirkt somit am besten; Pepton + Harn + K-Salpeter weniger gut, noch weniger endlich die Mischung Pepton + Ammonsulfat.

Versuchsreihe mit verschiedenen sauerstoffreichen Salzen als Zusatz zur Nähr- und Gärlösung.

Versuch 29.

Hefe (Brennereipreßhefe) 0,02 g

KClO₃ 0,0005 g

Harn (aufs Doppelte verd., mit PO₄K₂H
neutral.) 25 ccm

Rohrzucker (reinst) 2 g

Temperatur 20 bis 25⁰.

Nach 6 Tagen war der Zucker völlig vergoren.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nun 0,030 g.

Somit war die Hefetrockensubstanz binnen 6 Tagen um 354% gewachsen.

Versuch 30.

Hefe	0,02 g
KClO ₄	0,0005 g
Harn (aufs Doppelte verd., mit PO ₄ K ₂ H neutral.)	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Temperatur 20 bis 25°.	

Nach 6 Tagen war der Zucker völlig vergoren.

Die Trockensubstanzbestimmung lieferte nun 0,045 g.

Es war somit eine Trockensubstanzvermehrung um 581% binnen 6 Tagen eingetreten.

Versuch 31.

Hefe	0,02 g
MnO ₄ K	0,0005 g
Harn (aufs Doppelte verd., mit PO ₄ K ₂ H neutral.)	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Temperatur 20 bis 25°.	

Als nach 6 Tagen der Zucker völlig verschwunden war, lieferte mir die Trockensubstanzbestimmung 0,050 g Trockensubstanz.

Die Trockensubstanzvermehrung betrug somit 657% binnen 6 Tagen.

Versuch 32.

Hefe	0,02 g
Cr ₂ O ₇ K ₂	0,0005 g
Harn (aufs Doppelte verd., mit PO ₄ K ₂ H neutral.)	25 ccm
Rohrzucker (reinst)	2 g
Temperatur 20 bis 25°.	

Binnen 6 Tagen war der süße Geschmack der Lösung verschwunden.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nun 0,030 g.

Somit habe ich eine Trockensubstanzvermehrung von 354 % erhalten.

Versuch 33.

Hefe 0,02 g
 K_2HPO_4 0,5 g, d. i. 2 %
 Harn (aufs Doppelte verdünnt, mit
 PO_4K_3H neutral.) 25 ccm
 Rohrzucker (reinst) 2 g
 Temperatur 25 bis 25°.

Als nach 6 Tagen die Lösung nicht mehr süß schmeckte, machte ich die Trockensubstanzbestimmung.

Sie ergab mir 0,063 g.

Somit war die Trockensubstanz um 855 % binnen 4 Tagen vermehrt worden.

Der Zusatz von 2 % K_2HPO_4 hat sonach auf die Trockensubstanzvermehrung recht merklich günstig eingewirkt, aber nicht wegen seines Sauerstoffgehaltes, sondern als basisches Phosphat. Von den eigentlichen Sauerstoffträgern ($KClO_3$, $KClO_4$, MnO_4K , $Cr_2O_7K_2$) hat keines eine günstige Wirkung hervorgebracht.

Versuchsreihe in großer flacher Schale (23 cm Durchmesser und 7 cm Höhe mit ebenem Boden) bei Luftzutritt (Boden der Schale nur 3 mm hoch bedeckt).

Versuch 34.

Hefe (Brennereipreßhefe) 0,04 g (mit 0,013 g Tr.-S.)
 Harn (aufs Doppelte verd.,
 mit PO_4K_3H neutr.) 150 ccm
 Rohrzucker (reinst) 4 g
 Temperatur 20 bis 25°.

Versuchsgefäß: Flache, geräumige Schale mit ebenem Boden, der letztere 3 mm hoch mit der Versuchsflüssigkeit bedeckt.

Nach 3 Tagen war der Zucker verbraucht, die Hefe von griesigem makroskopischen Ansehen. Die Vermehrung der Hefe war sichtlich sehr groß. Unter dem Mikroskop zeigte sich deutlich, daß die Hefezellen nun geneigt waren, zu gestreckten

Formen auszuwachsen, viele waren schon mehr oder weniger wurstförmig geworden. Die Trockensubstanzbestimmung ergab nun 0,40 g, somit eine Trockensubstanzvermehrung um 2977% und ein Prozentverhältnis zwischen Trockensubstanz und angewandtem Zucker von 10%.

Versuch 35.

Hefe 0,04 g (mit 0,013 g Tr.-S.)
 Harn (aufs Doppelte verd.,
 mit $\text{PO}_4\text{K}_3\text{H}$ neutr.) 150 ccm
 Traubenzucker (technisch). 4 g
 Temperatur 20 bis 25%.

Versuchsgefäß: Flache, geräumige Schale (wie bei Versuch 34).

Hier wurde schon nach 2 Tagen die Trockensubstanzbestimmung gemacht. Geschmack der Flüssigkeit noch schwach süß. Die Hefe hatte sich offenbar sehr stark vermehrt, sie war noch feinpulverig. Unter dem Mikroskop zeigte sie sich durchaus normal. Die Trockensubstanz betrug nun 0,50 g. Es ergab sich somit eine Trockensubstanzvermehrung um 3746% und sonach ein Prozentverhältnis zwischen neuer Trockensubstanz und angewandtem Zucker von 12,5% (den angewandten Zucker zu 100% angenommen).

Das sind Zahlen, wie sie niemals sonst von mir erreicht wurden.

Der Luftzutritt hatte Wunder gewirkt.

Dabei war noch nicht einmal das Maximum des Luftzutrittes angewandt worden.

Ich hatte nur so viel Luft dazugebracht, als in die Nähr- und Gärlösung von selbst hineingeht, wenn dieselbe in flacher Schicht an der Luft ausgebreitet stehen bleibt.

Einige Male wurde auch umgeschüttelt, um die Sauerstoff-Aufnahme zu befördern.

Da die Gärung beständig weitergeht und damit immer wieder CO_2 erzeugt wird, welches Sauerstoff bei seinem Entweichen mitnimmt, so wird nicht viel Sauerstoff in der Flüssigkeit anwesend gewesen sein.

Trotzdem dieser Erfolg.

Immerhin sind die gärzerstörten Zuckermengen noch sehr groß (90 bis 88% des gesamten Zuckers in Versuchen 34 und 35).

Auch E. Buchner hat schon auf diesen Punkt aufmerksam gemacht. (Zymasegärung, S. 387):

„Trotz vollen Oberflächenwachstums, und obwohl der zur Gärung gelangende Zucker erst durch Diffusion zu den Hefezellen herangeschafft werden mußte, wurde durchschnittlich in unsern Versuchen etwa $\frac{1}{7}$ des überhaupt verbrauchten Zuckers durch Oxydation zerstört, mehr als $\frac{6}{7}$ dagegen fielen dem Gärungsvorgang anheim.“

Die Kulturstufe unserer Brauereien hält demnach mit außerordentlicher Zähigkeit an ihrer Gärtätigkeit fest.“

Man wird also immer mit einer starken Zerstörung von gärfähigem Zucker rechnen müssen.

Versuchsreihe mit Entfernung eines Teils der neugebildeten Hefe nach 24, 48, 72 Stunden.

Es sollte dadurch einer zu raschen Vergärung des Zuckers entgegengearbeitet werden.

Versuch 36

(Kontrollversuch ohne Entfernung der neugebildeten Hefe).

Hefe (Brennereipreßhefe)	0,02 g
Traubenzucker (technisch)	2 g
Harn (aufs Doppelte verdünnt, mit $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ neutral.)	25 ccm
Temperatur 20 bis 15°.	

Nach 4 Tagen wurde die Trockensubstanz bestimmt. Der Zucker war noch nicht ganz vergoren.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab 0,035 g.

Es hatte somit eine Zunahme der Trockensubstanz von 430% stattgefunden.

Mit diesem Versuch sind die folgenden (bis 40 inkl.) zu vergleichen.

Versuch 37.

Hefe (Brennereipreßhefe) 0,02 g (nach 24 Stunden wurde die Flüssigkeit von dem Bodensatz abgegossen)

Traubenzucker (technisch) 2 g
 Harn (aufs Doppelte verd.,
 m. $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ neutr.) 25 ccm
 Temperatur 20 bis 15°.

Nach 4 Tagen war auch hier der Zucker noch nicht ganz vergoren.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nur 0,038 g.

Somit hatte eine Trockensubstanzzunahme um 475% stattgefunden.

Durch das Abgießen nach 24 Stunden war somit eine kleine Erhöhung der Trockensubstanzvermehrung eingetreten.

Versuch 38.

Hefe (Brennereipreßhefe) . 0,02 g (nach 48 Stunden wurde die Flüssigkeit vom Bodensatz abgegossen und in neuem Reagensglas stehen gelassen)

Traubenzucker (technisch) . 2 g
 Harn (aufs Doppelte verd.,
 m. $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ neutr.) 25 ccm
 Temperatur 20 bis 15°.

Als nach 4 Tagen die Trockensubstanz bestimmt wurde, war der Zucker noch nicht ganz vergoren.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nun 0,030 g.

Somit war die Hefetrockensubstanz innerhalb 4 Tagen um 354% vermehrt worden.

Das Abgießen nach 48 Stunden bringt keinen Vorteil.

Versuch 39.

Hefe (Brennereipreßhefe) . 0,02 g (nach 72 Stunden
wurde abgegossen)
Traubenzucker (technisch) . 2 g
Harn (aufs Doppelte verd.,
m. $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ neutr.) 25 ccm
Temperatur 20 bis 15°.

Auch hier war nach 4 Tagen der Zucker noch nicht ganz vergoren.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nun 0,020 g.

Somit war die Hefetrockensubstanz in diesem Falle um 203%₀ gewachsen.

Das Abgießen nach 72 Stunden ist nicht vorteilhaft, sondern im Gegenteil nachteilig.

Versuch 40.

Hefe (Brennereipreßhefe) . 0,02 g (nach 24 Stunden und
nach 72 Stunden abge-
gossen)
Traubenzucker (technisch) . 2 g
Harn (aufs Doppelte verd.,
m. $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ neutr.) 25 ccm
Temperatur 20 bis 15°.

Als nach 4 Tagen nachgesehen wurde, zeigte sich der Zucker noch teilweise unvergoren.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nun 0,040 g.

Somit eine Trockensubstanzvermehrung um 506%₀.

Das Abgießen nach 24, 48 und 72 Stunden wirkt vorteilhaft.

Einen großen Erfolg hat somit das Abgießen der Lösung nicht gebracht.

Rückblick:

Der Ausfall der Trockensubstanzernte bei Hefekulturen im Harn, der mit gärfähigem Zucker versetzt ist, läßt sich durch verschiedene Umstände beeinflussen.

Schon in der ersten Abhandlung wurde hervorgehoben, daß ein sehr wichtiger Punkt die Aussaatmenge sei (diese

Zeitschr. 1917). Sie darf nicht zu groß genommen werden, sonst kann es leicht vorkommen, daß man eine Abnahme statt Zunahme erhält.

Ja, man kann den Eindruck bekommen, daß die besten Nährsubstanzen nicht nähren.

„Zunächst verdient hervorgehoben zu werden, daß mit den besten nährenden Kohlenhydraten trotz Darbietung aller sonst noch nötigen Nährstoffe (außer C, dieses nur als Kohlenhydrat) unter Umständen keine Trockensubstanzvermehrung eintritt.

Das ist dann der Fall, wenn zu Nährlösungen mit gärfähigem Zucker als ausschließlicher C-Nahrung größere Hefemengen gesetzt werden.

Die vorhin aufgezählten Versuche des Verfassers zeigen dies deutlich.

So oft zu den Nähr- und Gärlösungen 2 g Preßhefe auf 2 g Zucker genommen wurde, trat keine oder nur eine ziemlich geringe Trockensubstanzvermehrung ein.

Wurde nur 0,02 oder 0,05 oder 0,1 g usw. Preßhefe auf 2 g Zucker angewandt, dann vermehrte sich die Trockensubstanz aufs Vielfache.

Man wird das wohl kaum anders deuten können als so, daß man eine vorzeitige Vergärung des Zuckers annimmt.

In vielen Fällen wurde eine merkliche Abnahme der Trockensubstanz wahrgenommen.

Dabei waren aber alle nötigen Nährstoffe (Harnstoff als N-Quelle, Zucker als C-Quelle, Phosphate, Kali, Kalium, Magnesium) anwesend.

Die Abnahme ist auf Verbrauch von ursprünglich vorhanden gewesenen Reservestoffen wie Glykogen zu deuten.

Ob wirklich Zucker assimiliert wurde, kann nicht gesagt werden.

Ist dies der Fall gewesen, so ist jedenfalls der Verbrauch größer gewesen als die Neubildung.

Gärung und Assimilation wirken antagonistisch.

Nur der von der Gärung verschonte Zucker kann zur Ernährung gebraucht werden.

Der aufgenommene Zucker kann zur Synthese notwendiger Zellbestandteile, des Plasmas usw., verwendet, d. h. tatsächlich assimiliert werden, und dieser Teil steht wohl zum Gesamt-

zuwachs der Hefe in konstanter Beziehung. Zweitens wird zeitweise der Zucker bzw. das übrige Kohlenstoffmaterial als Reservestoff in Form von Glykogen aufgespeichert.

Es braucht diese Aufnahme nicht mit der Zellvermehrung parallel zu gehen.

Doch fand bei den oben beschriebenen Versuchen fast immer eine Zellvermehrung statt.

Ich konnte in der Regel eine lebhaftes Hefesprossung unter dem Mikroskop konstatieren.

Die Behauptung Pasteurs, daß zirka 1% des dargebotenen Zuckers, wenn Hefe in Gär- und Nährlösungen gebracht wird, zum Ansatz als Trockensubstanz gebracht wird, ist auch nicht durchaus als richtig anzuerkennen nach der negativen Seite hin.

Denn man kann den Versuch leicht so einrichten, daß trotz bester Nährstoffe die Hefetrockensubstanz nicht vermehrt, sondern verringert wird, wobei also scheinbar gar keine Assimilation stattfindet.

Weiterhin ersah ich aus den oben beschriebenen letzten Versuchen, daß ein sehr ausschlaggebender Faktor die Sauerstoffzufuhr sei, wenn man ihre Trockensubstanzvermehrung in Harnlösungen, die nur Zucker als C-Quelle enthalten, bekommen will in einem für die Praxis brauchbaren Maße und unter Einsparung von Zucker.

Die gewöhnlichen Hefevermehrungsversuche, bei denen infolge der Kohlensäureentwicklung bei der Gärung und durch den Mangel einer besonderen Sauerstoffzufuhr, alle Ernährungsvorgänge unter völligem Ausschluß von Sauerstoff sich abspielen, erfordern zu viel Zucker. Auf 100 Teile Zucker erhält man bis einige Teile Trockensubstanz, kaum jemals mehr als 5 Teile.

Offenbar ist die intramolekulare Atmung (Gärung) für die Trockensubstanzbildung bei weitem keine so günstige Energiequelle wie die Sauerstoffatmung.

Ich erhielt bei den wenigen Versuchen, die ich bis jetzt in recht primitiver Weise, einfach unter Ausbreitung der Hefe mit der Nähr- und Gärlösung in flacher Schicht anstellte, eine Trockensubstanzausbeute von über 10% des Zuckers (mit Rohrzucker).

Auch zweifle ich nicht daran, daß auf diesem Wege noch

mehr gewonnen werden kann. Denn es ist geradezu erstaunlich, wie enorm das Wachstum der Hefe durch den Luftzutritt gefördert wird. Alle anderen Mittel scheinen dagegen zurückzutreten.

Schon Pasteur hat nachgewiesen, daß die Hefevegetation an der Oberfläche einer Gär- und Nährlösung sehr lebhaft ist, wenn sie mit einer großen Luftmenge in Berührung steht.

Hingegen fällt dann die Gärung im Verhältnis zur Hefevermehrung schwach aus.

Brefeld hat dann hervorgehoben, daß der Sauerstoff für alle Organismen notwendig sei und daß gerade die Bierhefe ein Beispiel hierfür abgebe.

Freilich vermag die Bierhefe, bei richtiger Versuchsanstellung, ohne Sauerstoff normal zu sprossen, ebenso wie umgekehrt bei reichlichem Sauerstoffzutritt noch Gärung stattfindet.

Chudiakow wollte einen hemmenden Einfluß des Sauerstoffes auf die Gärung konstatieren (Landw. Jahrb. 23, 391).

Dagegen traten wiederum H. Buchner und Rapp auf, die zeigten, daß die Durchleitung von Luft durch eine gärende Zucker- und Nährlösung nur gesteigertes Hefewachstum zur Folge hat.

Das ist auch der Eindruck, den ich bei meinen eigenen Versuchen hatte.

Denn der Zucker wurde bei dem einen meiner Luftversuche binnen 3 Tagen völlig verbraucht, wiewohl nur etwa $\frac{1}{10}$ des Zuckers in Hefetrockensubstanz umgesetzt wurde.

Der übrige Zucker wurde zum größten Teil vergoren.

Die Hefe ist an die Gärung angepaßt.

Diese Anpassungsfunktion ist so sehr im Organismus des heutigen Bierhefepilzes festgewurzelt, daß es nicht möglich ist, selbst unter absolut aerobischen Existenzbedingungen, unter denen scheinbar die Gärtätigkeit ganz überflüssig wird, diesen Pilz bei Zuckeranwesenheit ohne starke Gärtätigkeit zu kultivieren (E. Buchner, Zymasegärung S. 388).

Auch durch längerdauernde Züchtung unter aerobischen Existenzbedingungen kann der Hefe die Gärleistung nicht abgewöhnt werden.

Wir müssen also mit einem großen Zuckerverbrauch immer rechnen.

Bemerkungen über die Anwendung von Harn verschiedener Herkunft zur Hefeauzucht (siehe auch A. Br.- u. H.-Ztg. 1916).

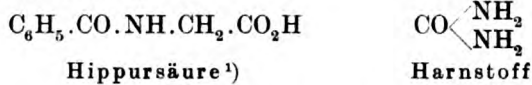
Der Harn ist nicht immer gleich zusammengesetzt.

Insbesondere wechselt der stickstoffhaltige Bestandteil bei Harn verschiedener Abkunft.

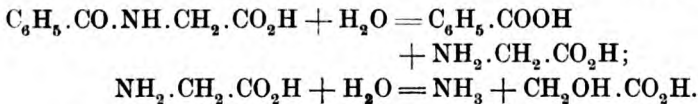
Bei Pflanzenfressern ist das Endprodukt des Eiweißstoffwechsels vielfach ein anderes wie bei Fleischfressern und dem Menschen.

Wie stellt sich jedes derselben zur Ernährung der Hefe?

Es handelt sich um die zwei Amidverbindungen Hippursäure und Harnstoff:



Eine Spaltung der Hippursäure in ihre Komponenten ist nach dem, was man sonst von der Hefe und anderen lebenden Zellen weiß, durchaus nicht unwahrscheinlich. Die freigewordene Benzoesäure kann wahrscheinlich nicht zur Ernährung der Hefe dienen, vermutlich wirkt sie sogar schädlich auf diese ein. Hingegen ist das Glykokoll als N-Quelle für die Hefe verwendbar. Deshalb muß hier weiter gespalten werden (in Ammoniak und Glykolsäure) unter Wasseraufnahme:



Was mit der Glykolsäure geschieht, ob dieselbe als C-Quelle Verwendung finden kann, ist noch nicht sicher festgestellt. Doch ist es, nachdem sogar die Essigsäure zur Pilzernährung dienen kann, nicht unwahrscheinlich, daß sie eine Verwendung zur Kohlenstoffernährung findet.

Zunächst stellte ich durch folgende Versuche fest, ob Hippursäure (wie Harnstoff) eine Stickstoffquelle für Hefe sei.

Hippursäure . . .	0,50 g als einzige N-Quelle
Monokaliphosphat . .	0,05 g
Magnesiumsulfat . .	0,02 g

¹⁾ Im Harn der Pflanzenfresser in größerer Menge (neben Harnstoff) enthalten.

Rohrzucker	2,50 g
Brunnenwasser	50,00 g
Hefe	Spur.

Nach 3 Tagen Aufenthalt im warmen Zimmer zeigte die Flüssigkeit keine Trübung. Auch nach 5 Tagen war keine solche zu bemerken. Da die Lösung beträchtlich sauer reagierte, machte ich den Versuch nun mit der möglichst genau neutralisierten Lösung; zur Neutralisation wurde Kalilauge verwendet. In dieser neutralisierten Lösung trat nach 3 Tagen Trübung ein. Nach 5 Tagen war die Trübung stärker, etwas Bodensatz war vorhanden. Unter dem Mikroskop waren zahlreiche Hefensproßverbände zu erkennen, daneben viele feine Pilzfäden, deren Art nicht bestimmt wurde.

Die Hefe war freilich der großen Mehrzahl nach nicht Bierhefe, sondern eine kleinere (wilde) Hefenart. Auch hörte die Hefenvermehrung bald auf.

Harnstoff	0,50 g als einzige N-Quelle
Monokaliphosphat	0,05 g
Magnesiumsulfat	0,02 g
Rohrzucker	50,00 g
Hefe	Spur.

Schon nach 2tägigem Aufenthalt im warmen Zimmer war Trübung eingetreten. Die mikroskopische Untersuchung lehrte, daß zahlreiche frische Sproßverbände aller Grade vorhanden waren. Die Flüssigkeit zeigte bereits einen Anfang von alkoholischer Gärung, so stark hatte sich die Spur Hefe, die anfangs zugesetzt worden war, vermehrt. Nach weiteren 2 Tagen war die Gärung noch stärker, die Hefenvermehrung noch reichlicher eingetreten, und weiterhin hielt das Wachstum an. Somit kann der Harnstoff als N-Quelle dienen, und zwar in derselben nicht neutralisierten Lösung, in der die Hippursäure versagt. Das Neutralisieren war übrigens hier gar nicht nötig, da die Lösung nur eine kaum merkliche saure Reaktion besaß (von dem Monokaliphosphat herrührend). Dieser Versuch stimmt sehr gut zu den früher vom Verfasser über Ernährung der Hefe und Harn angestellten Ernährungsversuchen.

Der Harn des Menschen hat folgende Zusammensetzung:

Harnstoff	2,80 g
Harnsäure	0,04 g

Mineralstoff	1,70 g	} 0,1 Schwefelsäure + 0,2 Phosphorsäure + 1,1 Kochsalz usw.
Kreatinin	0,10 g	
Urobilin	Spur	
Zucker	Spur	
Wasser	95,00 g.	

Der Harn von pflanzenfressenden Säugetieren enthält als Stickstoffausscheidung neben Harnstoff auch Hippursäure (die beim Menschen nur in kleinen Mengen auftritt) in erheblicher Menge, manchmal mehr als Harnstoff. Beim Pferd schwankt die Menge zwischen 1 und 2,5%, bei der Kuh und Ziege ist sie oft noch größer. Beim Menschen kommen nur geringere Mengen Hippursäure im Harn vor, nämlich bis zu 0,1%. Da zu den Pflanzenfressern unsere landwirtschaftlichen Zuchttiere gehören, so entsteht die Hippursäure in jedem Stall und fällt mit dem Harn der Tiere an. Ihr physiologisches Verhalten ist also auch von ökonomischer Bedeutung.

Versuche darüber, ob Hippursäure und Harnstoff eine C-Quelle für die Hefe seien:

Hippursäure	0,50 g
Monokaliphosphat	0,05 g
Magnesiumsulfat	0,02 g
Brunnenwasser	50,00 g
Hefe	Spur.

Nach 3 Tagen war noch keine Hefentrübung eingetreten. Auch nach 4 Tagen nicht, am 5. ebenfalls noch nicht. Da der negative Ausfall möglicherweise mit der erheblich sauren Reaktion zusammenhängen konnte, so stellte ich mir eine neue Lösung derselben Art her und neutralisierte sie möglichst genau mit Kalilauge. Als diese Lösung 4 Tage im warmen Zimmer gestanden war, zeigte sich kein Pilzwachstum. Es war insbesondere keine Hefe in derselben gewachsen. Als ich noch weitere 6 Tage abwartete, zeigte sich schließlich an der Oberfläche ein Schimmelfräschen. Sollte am Ende doch der Schimmelpilz die Hippursäure als (wenigstens schlechte) Kohlenstoffquelle verwenden können? Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, daß eine Verunreinigung der Hippursäure mit einer wirklichen Kohlenstoffquelle daran schuld war.

Harnstoff	0,50 g
Monokaliphosphat	0,05 g
Magnesiumsulfat	0,02 g
Brunnenwasser	50,00 g
Hefe	Spur.

Nach 3 Tagen war noch keine Hefentrübung eingetreten. Auch nach 4 Tagen nicht; ebenso nach 5 Tagen. Da hier kein Zucker und auch keine andere C-Quelle beigegeben war, muß der Versuch so ausgelegt werden, daß der Harnstoff bei den in der vorstehenden Nährlösung gebotenen Bedingungen nicht als C-Quelle dienen kann. Sogar nach weiteren 6 Tagen war noch keine Spur von Pilzbildung zu erkennen, während bei Hippursäure etwas Schimmel da war.

Auch Naegeli und Loew haben ja den Harnstoff schon als zur Kohlenstoffernährung der Pilze nicht oder wenig geeignet erkannt. Bei beiden (Hippursäure und Harnstoff) ist das Resultat ziemlich leicht zu begreifen. Die Verwendung von Harnstoff zur N-Ernährung der Hefe erklärt sich aus dem Umstand, daß der Harnstoff leicht in kohlen-saures Ammoniak (unter Wasseraufnahme) übergehen kann. Das letztere ist eine N-Nahrung für Hefe; dabei wird das Ammoniak zur Eiweißbildung gebraucht, die Kohlensäure wird als unbrauchbar ausgeschieden. Aus dem Auftreten des Harnstoffkohlenstoffs als Kohlensäure erklärt sich recht einfach, warum der Harnstoff nicht als C-Quelle dienen kann. Bei der Hippursäure ist zu bedenken, daß dieselbe leicht in Benzoesäure und Glykokoll gespalten wird. Letzteres aber ist eine N-Nahrung für Hefe, indem es in Ammoniak und Glykolsäure zerfällt; ersteres dient zur Eiweißbildung. Hinsichtlich der Verwendung der Hippursäure kommen die Spaltungsprodukte Benzoesäure und Glykolsäure in Betracht. Erstere dürfte wohl kaum zur C-Ernährung dienen. Denn fürs erste ist der Benzolkern schwer angreifbar; fürs zweite wirkt die Benzoesäure schädlich. Letzteres dürfte wohl auch der Grund sein, warum die N-Ernährung mit Hippursäure viel schlechter gelingt als mit Harnstoff. Die freiwerdende Benzoesäure gebietet dem Hefenwachstum bald Stillstand. Daß Schimmel in bescheidenem Maße nach längerer Zeit in der zuckerfreien Hippursäurelösung wuchs, beruht wohl darauf, daß Schimmelpilze weniger empfindlich gegen Benzoe-

säure sind und daß sie die Glykolsäure zur C-Ernährung zu gebrauchen vermochten.

Wenn der Harn als günstiges Substrat zur Hefeauzucht geschildert wird, so bezieht sich das auf die Brauchbarkeit des Harnstoffes als N-Nahrung (sowie auf den Gehalt an Phosphaten).

Wir sehen, daß gar viele organische Stickstoffverbindungen zur Ernährung der Hefe dienen können. Das ist aber praktisch so zu nehmen, daß nur wenige derselben für die Aufzucht der Hefe in Betracht kommen. Zu diesen praktisch wichtigen N-Verbindungen gehören auch der Harnstoff und die Hippursäure. Beide können, wie oben dargelegt wurde, nur als Stickstoffquelle dienen, nicht als C-Quelle. Die Hippursäure ist aber als N-Quelle weit weniger geeignet als der Harnstoff, vermutlich weil sich die giftige Benzoesäure daraus bildet. Harn von Pflanzenfressern ist weniger zur Hefenernährung geeignet als der von Fleischfressern oder der vom Menschen.

Man wird diesen Dingen fortgesetzte Aufmerksamkeit zuwenden müssen, da die Erzeugung von Hefe im großen wohl immer mehr in Schwung kommen wird. Die Vorzüge der Hefe als Eiweißproduzent gegenüber den grünen Pflanzen sind bekannt. Die Hefe arbeitet rascher, braucht kein Licht, wächst zu jeder Jahreszeit. Es ist eines der interessantesten und größten Probleme, um das es sich handelt. Kann man den Anbau von grünen Nährpflanzen und damit die Landwirtschaft bei der Nährstofferzeugung bis zu einem gewissen Grade umgehen? Damit soll natürlich nicht in Frage gestellt werden, daß die Landwirtschaft auch in Zukunft die Ernährerin von Mensch und Tier sein wird. Es handelt sich nur um eine Unterstützung, die der Landwirtschaft geleistet werden soll durch das Heranzüchten von rasch wachsenden eiweißreichen Hefepilzen im großen. Daß die getrocknete Hefe als Kraftfuttermittel brauchbar ist, wurde an den in Bierbrauereien und Brennereien abfallenden Hefenmengen längst von den Landwirten ausprobiert. An diese Wendung der Hefenernährungsfrage hat wohl Naegeli nicht gedacht, als er seine berühmte Abhandlung über die Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen vorlegte (Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. München, 5. Juli 1879). Dieselbe enthält

die Keime zu der heutigen Hefenforschung, soweit sie ernährungsphysiologisch ist. Versuche mit Ammonsalzen, auch mit Harnstoff als Stickstoffquelle kommen darin vor, Zucker und Glycerin sind als Kohlenstoffquellen für Hefe erprobt worden, die Rolle des Sauerstoffs bei der Hefenernährung wurde studiert usw. Es fehlt nur die Rücksichtnahme auf die verschiedenen Hefenrassen, da dieselben damals nicht bekannt waren.

Es dürfte bei dem Aufsehen, das das Hefenproblem gegenwärtig macht, von aktuellem Interesse sein, einige Proben jener ersten und bahnbrechenden Versuche zu vernehmen, denn die Dankeschuld erfordert es; auch können wir noch heute manches aus jenen Forschungen lernen. Naegeli hat sogar schon den Torf als Ernährer von Pilzen ins Auge gefaßt. „Derselbe wurde in der Kälte oder in der Wärme mit Wasser, das 0,5⁰/₀ kohlen-saures Ammoniak enthielt, ausgelaugt und die Lösung zu den Versuchen benutzt. Oder es wurden die Gläser zur Hälfte mit Torf und dann zu drei Viertel mit Wasser gefüllt, das entweder keinen Zusatz erhielt oder mit 0,2 bis 0,5⁰/₀ kohlen-saurem Ammoniak, mit 0,2⁰/₀ Ammoniak und mit 0,1⁰/₀ Kali versetzt war. Die Gläser erfuhren entweder keine weitere Behandlung oder sie wurden zunächst während längerer Zeit (20 Stunden) einer Temperatur von 90 bis 92^o ausgesetzt. Die Lösungen, die einen Zusatz von kohlen-saurem Ammoniak, von Ammoniak oder von Kali erhalten hatten, reagierten schwach alkalisch oder sie waren beinahe neutral; diejenigen ohne Zusatz zeigten äußerst schwach saure Reaktion. Die Kulturresultate waren sehr verschiedene. Einige Male bildete sich in den Lösungen bald eine mehr spärliche, bald eine reichliche Vegetation von Spaltpilzen (Mikrokokkus und Spirillum, seltener Bakterien), in der sich dann auch Monaden einstellten. Einmal blieb jede Pilzbildung aus. Ich setze den negativen Erfolg auf Rechnung der Unlöslichkeit der Humus-substanzen, nicht etwa, wie man allenfalls vermuten könnte, auf den Mangel an mineralischen Nährsalzen, an denen mancher Torf sehr arm ist; denn es stellte sich eine ziemlich reichliche Algenvegetation ein.“

Die Versuche sprechen dafür, daß man Torf zur Ernährung von Pilzen verwenden kann. Besondere Ver-

suche mit Hefe stehen noch aus. Es ist übrigens bei den verhältnismäßig großen Ansprüchen, die Hefe an die C-Nahrung stellt, nicht wahrscheinlich, daß ihr die löslichen Humussubstanzen des Torfes genügen. Möglich aber ist es, daß sie dieselben in Verbindung mit besseren Nährstoffen verzehrt. Versuche mit Harn und Sproßpilzen haben unter gewissen Umständen positives Resultat ergeben.

Harn ernährt nach Naegeli bei Luftabschluß die Sproßpilze nicht, man mag ihn mit Säure versetzen oder nicht. Bei Luftzutritt vermag er ziemlich reichliche Sproßhefe zu bilden, wenn man ihm zur Abhaltung der Spaltpilze 0,5 bis 1% Weinsäure oder Citronensäure zufügt. Bei Zusatz von Glycerin (4,5 bis 9%) vermehren sich die Sproßpilze, wenn die Luft abgehalten wird, ebenfalls nicht; dagegen begünstigt das Glycerin die Vermehrung bei Luftzutritt sehr beträchtlich (Naegeli a. a. O., S. 321). Als Kohlenstoffquelle scheint in ersterem Falle die Weinsäure und Citronensäure zu dienen, denn der Harnstoff (Hauptbestandteil des Harns) kann, wie Naegeli anderweitig gefunden hat, nicht als Kohlenstoffquelle für Hefe dienen. Wird der Harn mit Zucker (9%) und Säure (0,5 oder 1% Zitronensäure) versetzt, so findet bei Luftabschluß reichliche Sproßhefenbildung, dann aber auch Spaltpilzbildung statt, was wohl so zu erklären ist, daß der Harnstoff in kohlen-saures Ammoniak übergeht, wodurch die Säure neutralisiert wird. — Enthält der Harn 9% Zucker und 4,5% Alkohol (absolut), so bleibt bei Abschluß von Luft die Vermehrung der Sproß- und Spaltpilze aus; während bei Luftzutritt zuerst die Spaltpilze sich vermehren und Milchsäure erzeugen, worauf die Sproßpilze zu wachsen beginnen.

Wir sehen, daß Hefe mit den Nährstoffen des Harns gedeiht, wenn eine gute C-Quelle zugesetzt wird, bei Darbietung von Zucker braucht sie nicht einmal Sauerstoff. Pflanzenernährung eignet sich aber weniger wie menschlicher (weil Hippursäure ungünstiger ist). Da der Harn auch reichlich Phosphat enthält, so stellt er eine sehr günstige Hefennahrung dar, wenn auch Zucker zugefügt wird. Die Notwendigkeit des Zucker-(Melasse-)Zusatzes ist nun der springende Punkt in der ganzen Hefenerzeugungsfrage. Über die Stickstoffzufuhr braucht man sich weniger Sorge zu machen,

da derselbe als Ammoniaksalz oder als Harn zugeführt werden kann. Das Ammoniak kann in beliebiger Menge aus der Luft hergestellt werden, gegen die Verwendung des Harns dürften sich kaum Stimmen erheben. Die Billigkeit des letzteren kommt dem Preis der erzeugten Hefe zugute. Zucker aber ist eine wertvolle Substanz, die von der Landwirtschaft zu Futterzwecken begehrt wird. Ohne Zucker aber scheint die geplante Hefenerzeugung nicht zu gelingen, wiewohl es für Hefe noch manche andere Kohlenstoffquellen gibt.

Der Zusatz von gärfähigem Zucker bringt immer den einen großen Vorteil, daß durch die Gärung eine für die Hefe günstige Position geschaffen wird, wodurch sie zunächst das Übergewicht über andere Pilze, namentlich Bakterien, gewinnt.

Ferner hält die Gärung die Hefe beständig schwebend und wandernd, so daß hierdurch der Ernährungsvorgang weit leichter geschehen kann, als wenn die Hefe sich am Boden festgesetzt hat.

Von großer Bedeutung für die Hefeaufzucht scheint ferner die Luftzufuhr zu sein. Ohne sie leidet die Hefe.

So sehr man auch geneigt war, die Gärung als vollen Ersatz für den Atmungsvorgang zu nehmen, lehren doch die Erfahrungen bei der Hefeaufzucht, daß die Sauerstoffatmung nicht vollwertig durch die intramolekulare Atmung ersetzt wird.

Denn der Trockensubstanzansatz geht offenbar viel langsamer vor sich, wenn der Sauerstoff ausgeschlossen wird.

Vermutlich leiden auch andere Vorgänge unter dem Sauerstoffmangel.

Das Verhältnis zwischen verbrauchtem Zucker und Trockensubstanzgewinn läßt sich nur dann wirklich günstig gestalten, wenn man Luftzutritt zur Hefe bewirkt.

Über die Saccharophosphatase der Hefen und die Vergärung der Rohrzuckerphosphorsäure.

Von

Kemal Djenab, Konstantinopel, und Carl Neuberg, Berlin-Dahlem.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Chemische Abteilung, Berlin-Dahlem.)

Mit 1 Figur im Text.

In Form esterartiger Abkömmlinge der Phosphorsäure ist der Phosphor am Aufbau von Naturstoffen beteiligt, die zu den wichtigsten Bestandteilen der Zelle gehören. Solche phosphorhaltigen Verbindungen kennt man in der Reihe der Eiweißkörper, der Fette und der Kohlenhydrate; das Casein, das Lecithin und die Nucleinsäuren sind typische Vertreter dieser Gruppen. Die Bedeutung dieser Substanzen für den Stoffwechsel tritt auch darin zutage, daß kräftig wirkende Fermente, die ihren Umsatz zu besorgen imstande sind, weit verbreitet sind. Die Loslösung des Phosphors als Phosphorsäure bei der tryptischen Verdauung des Caseins, die Abspaltung von Phosphorsäure bei der Zerlegung des Lecithins und ihr Auftreten beim Abbau der Nucleinsäuren sind bekannte Vorgänge.

Die starke Neigung der Lebewesen, organisch gebundenen Phosphor in ihren Stoffwechsel einzubeziehen, enthüllt sich aber auch darin, daß sie synthetisch dargestellte Phosphorsäureester verwerten, bzw. die für ihre Umwandlungen erforderlichen Fermente besitzen. So konnten C. Neuberg und W. Örtel¹⁾ zeigen, daß auf chemischem Wege phosphorylierte Eiweißkörper sowie Albumosen und Peptone, in die künstlich der Phosphorsäurerest eingeführt worden war, unter dem Einflusse von Verdauungsfermenten Phosphorsäure in anorganischer

¹⁾ C. Neuberg und W. Örtel, diese Zeitschr. **60**, 491, 1914.

Form abspalten. Ferner hat sich feststellen lassen, daß synthetisches glycerinphosphorsaures Natron, das von dem entsprechenden Spaltungsprodukte der Phosphatide sicher verschieden ist, durch Hefen¹⁾ in reichlicher Menge hydrolysiert sowie von tierischen Organen²⁾ zerlegt wird.

Da somit jene künstlich erzeugten Phosphorverbindungen, die zur Klasse der Phosphorproteine und der Phosphatide in Beziehung stehen, trotz ihrer mehr oder minder körperfremden Natur auf enzymatischem Wege gespalten werden, bot die Frage Interesse, ob auch ein in der Natur nicht vorkommender Kohlenhydrat-phosphorsäureester der biologischen Zerlegung fähig ist.

Ein geeignetes Objekt für derartige Studien liegt in der Saccharosemonophosphorsäure vor, die C. Neuberg und H. Pollak³⁾ vor mehreren Jahren dargestellt haben. Diese Substanz, die nach verschiedenen Richtungen Beachtung verdient, kann insofern als körperfremd gelten, als die bekannten natürlichen Kohlenhydratphosphorsäureester ganz anderen Typen angehören. Die im Kohlenhydratstoffwechsel der Hefe auftretende Phosphorsäureverbindung ist die Fructosediphosphorsäure; bestimmten Gehirn- und Organlipoiden liegt die Galaktosephosphorsäure zugrunde, und als Gerüst der Nucleinsäuren sind Pentosenphosphorsäuren anzusehen. Eine Phosphorsäureverbindung von Disacchariden ist als Naturprodukt jedoch bisher nicht beobachtet worden.

Zunächst⁴⁾ wurde untersucht, ob sich in der Hefe ein Ferment findet, das aus der Lösung von saccharophosphorsäuren Salzen Phosphate abzuspalten imstande ist.

Ein solches Enzym ist in reichlicher Menge in der Hefe nachweisbar, und zwar in untergärigen wie obergärigen Rassen. Dasselbe wirkt kräftig in Gegenwart von Toluol auf die Salze der Saccharosephosphorsäure. Während ihre Lösungen selbst

¹⁾ C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. **36**, 64, 1911.

²⁾ P. Grosser und J. Husler, diese Zeitschr. **39**, 1, 1912.

³⁾ C. Neuberg und H. Pollak, diese Zeitschr. **23**, 515, 1910; **26**, 514, 1910; Ber. der Deutsch. chem. Ges. **43**, 2060, 1910.

⁴⁾ Studien über die Einwirkung von tierischen Organen auf Saccharophosphate sowie erweiterte Versuche über ihr Verhalten zu Fermenten der Hefen und anderer Mikroorganismen sollen später folgen.

bei langem Kochen keine Spur einer Fällung mit Magnesia-mischung ergeben, tritt diese Reaktion nach erfolgter Einwirkung von frischen Hefen oder von Hefenmacerationsaft stark auf. Z. B. ist schon bei Verwendung von 10 g abgepreßter = 2,53 g trockner obergäriger Hefe auf 100 ccm einer 5⁰/₀igen Lösung von saccharosephosphorsaurem Natron in Gegenwart von reichlich Toluol nach 2 stündiger Aufbewahrung bei 37⁰ das Auftreten von anorganischen Phosphaten nachweisbar, und nach 8 Tagen¹⁾ sind mehr als $\frac{2}{3}$ des vorhandenen Phosphors als Phosphat abgespalten (s. S. 400 bis 403). Die Reaktion tritt bereits bei Zimmertemperatur ein, schneller im Brutschrank bei 37⁰. In allen Fällen zeigen die vorgenommenen Kontrollen, daß unter gleichen Bedingungen die Lösungen der Saccharosephosphate selbst völlig beständig sind und daß aus der angewandten Hefenmenge für sich nur vergleichsweise ganz unbedeutende Mengen von Phosphaten abgegeben werden. Die Zerlegung der Saccharophosphate durch diese Hefenphosphatase erfolgt in solchem Ausmaße, daß aus einer 10⁰/₀igen Lösung des Calciumsalzes innerhalb zweier Tage ein dicker Brei von gallertigem Calciumphosphat entsteht, der so zäh ist, daß die Gefäße umgekehrt werden können, ohne daß das Magma ausläuft.

Außer durch Bestimmung des abgespaltenen Phosphats läßt sich auch polarimetrisch die Einwirkung des neuen Hefenferments auf die saccharosephosphorsauren Alkalisalze bequem verfolgen, indem ein erheblicher Drehungsabfall mit zunehmendem Umfang der Spaltung eintritt. Freilich stellt sich dabei auch Reduktionsvermögen ein, das durch gleichzeitige Einwirkung der Invertase auf den freigewordenen Rohrzucker zustande kommt. Unter diesen Umständen erfolgen Phosphorsäurelösung und Rohrzuckerhydrolyse scheinbar nebeneinander. Ob auf enzymatischem Wege eine Verwirklichung nur eines dieser beiden Spaltungsvorgänge möglich ist, soll noch untersucht werden.

Das Ferment, das diese Umwandlung bewirkt, wollen wir Saccharophosphatase nennen; denn es ist zweifelhaft, in welcher Beziehung es zu der bekannten, von Harden und

¹⁾ Nach 2 Tagen ist rund die Hälfte hydrolysiert.

Young entdeckten Hexosediphosphatase steht. Erwiesenermaßen ist die Hexosediphosphorsäure durch lebende Hefen nicht vergärbbar, d. h. frische Hefen können diesen Phosphorsäureester nicht angreifen. Im Gegensatz dazu werden, wie wir jetzt gefunden haben, die Saccharophosphate von bestimmten lebenden Hefen unter Abspaltung von phosphorsauren Salzen, d. h. unter Beteiligung der Saccharophosphatase, vergoren. Bei Gegenwart von geeigneten Zellgiften unterbleibt die Gärung und tritt die reine Saccharophosphatasewirkung — neben der Invertinspaltung — zutage. In diesem Umstande offenbart sich zugleich die rein enzymatische Natur des Vorgangs. Sie wird bestätigt durch das Verhalten der Macerationssäfte aus untergärigen Hefen, die unter antiseptischen Bedingungen Phosphatloslösung aus der Rohrzuckerphosphorsäure und sekundär ihre ziemlich glatte Vergärung bewirken. Zum Unterschiede von der Hexosediphosphatase, die nur in Hefesäften nachweisbar wird, nicht aber in den intakten Hefezellen, ist die Saccharophosphatase in allen Hefepräparaten vorhanden. Sie ist auch zum Unterschiede von der ersteren unempfindlich gegen Toluol. Erwähnenswert ist noch, daß die Saccharophosphatase sowohl auf genau neutralisierte Lösungen der Rohrzuckerphosphorsäure als auch bei schwach alkalischer oder essigsaurer Reaktion wirkt, bei der die Saccharophosphate selbst beständig sind.

Nachstehende Versuchsergebnisse stellen die Belege für die gemachten Angaben dar. Dazu bemerken wir folgendes:

Die Rohrzuckerphosphorsäure kam in Form des reinen Natrium- und Calciumsalzes zur Anwendung. Beide Verbindungen, die nach dem Verfahren von C. Neuberg und H. Pollak¹⁾ gewonnen waren, werden jetzt von der Firma E. Merck in Darmstadt unter den Namen Hesperonalnatrium und Hesperonalcalcium²⁾ in den Handel gebracht. Da die Hesperonalpräparate die reinen Salze der Rohrzuckerphosphorsäure sind, so hat man in ihnen ein sehr bequemes Ausgangsmaterial für entsprechende Enzymstudien.

Das saccharosephosphorsaure Natrium hat die Zusammen-

¹⁾ l. c.

²⁾ D.R.P. 247 809.

setzung $C_{12}H_{21}O_{14}PNa_2 = C_{12}H_{21}O_{10} \cdot O \cdot PO_3Na_2$ (Mol.-Gew. 466) und das Calciumsaccharophosphat die Formel $C_{12}H_{21}O_{14}PCa = C_{12}H_{21}O_{10} \cdot O \cdot PO_3Ca$ (Mol.-Gew. 460).

A. Zerlegung der Saccharophosphate durch frische Oberhefen in Gegenwart von Toluol bei 25° und 37°.

Temperatur 25°.

1. 10,0 ccm 5⁰/₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium,
1,0 g Hefe XII,
1,0 ccm Toluol.

Nach 3 Tagen: Die klar filtrierte Flüssigkeit¹⁾ gibt eine äußerst starke Fällung mit Magnesiamischung und reduziert Fehlingsche Lösung aufs kräftigste.

2. 10,0 ccm 5⁰/₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium,
1,0 ccm H₂O²⁾,
1,0 ccm Toluol.

Nach 3 Tagen: Weder Phosphatabspaltung noch Reduktionsvermögen.

3. 10,0 ccm Wasser,
1,0 g Hefe XII,
1,0 ccm Toluol.

Nach 3 Tagen: Mit Magnesiamischung eine leichte Trübung, mit Fehlingscher Lösung äußerst schwaches Reduktionsvermögen, herrührend von einer minimalen Phosphatabgabe und Zuckerbildung durch Selbstersetzung der verwendeten Hefe.

¹⁾ Hier wie in allen übrigen Fällen haben wir mit bestem Erfolge das feinporige neue Filtrierpapier der Firma Macherey, Nagel & Co. in Düren benutzt.

²⁾ Dieser Wasserzusatz kommt etwa dem Volumen der angewendeten Hefenmenge gleich; ebenso verfahren wir bei den entsprechenden folgenden Ansätzen.

Temperatur 37°.

4. 20,0 ccm 5%ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium, die schwach alkalisch auf Lackmus reagiert,
2,0 g Hefe OM,
1,5 ccm Toluol.

Nach 2 Tagen: Im klaren Filtrat erzeugt Magnesiamixtur einen dicken Niederschlag, Fehlingsche Lösung wird stark reduziert.

5. 20,0 ccm 5%ige Lösung von schwach alkalisch reagierendem Saccharosephosphat,
2,0 ccm H₂O,
1,5 ccm Toluol.

Nach 2 Tagen keinerlei Veränderungen.

6. 20,0 ccm H₂O,
2,0 g Hefe OM,
1,0 ccm Toluol.

Nach 2 Tagen: Spur einer Fällung mit Magnesialösung, keine Reduktion mit Fehlingscher Mischung.

7. 20,0 ccm 5%ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium, mit Essigsäure gegen Lackmus genau neutralisiert,
2,0 g Hefe OM,
1,5 ccm Toluol.

Nach 2 Tagen: Im klaren Filtrat starke Fällung durch Magnesiamixtur und intensive Reduktion von Fehlingscher Lösung.

8. 20,0 ccm 5%ige, gegen Lackmus mit Essigsäure neutralisierte Lösung von Natriumsaccharophosphat,
2,0 ccm H₂O,
1,5 ccm Toluol.

Wurde selbst nach 11 Tagen ohne jede Veränderung befunden.

9. Kontrolle allein mit Hefe wie unter 6.
10. 20,0 ccm 10%ige Lösung von saccharosephosphor-

saurem Calcium, schwach alkalisch gegen Lackmus reagierend,

2,0 g Hefe XII,

1,0 ccm Toluol.

Nach 2 Tagen erfüllte ein dicker Brei von Calciumphosphat das Gefäß. Die zusammenhängende Gallertsäule preßt auch nach Tagen kein Wasser aus und läßt sich nur schwer mit einem Glasstabe zerteilen. Durch Auswaschen mit Wasser kann man eine Lösung erhalten, in der lösliches saures phosphorsaures Calcium und reduzierender Zucker vorhanden sind.

11. 20,0 ccm 10⁰/₀ige Lösung von schwach alkalischem Calciumsaccharosephosphat,

2,0 ccm H₂O,

1,0 ccm Toluol.

Nach 2 Tagen: Das Gemisch bleibt völlig klar, gibt auch mit Magnesialösung keine Fällung und reduziert nicht. Mit gleichem Ergebnis nach 9 Tagen geprüft.

12. 20,0 ccm H₂O,

2,0 g Hefe XII,

1,0 ccm Toluol.

Nach 2 Tagen: Spuren von freiem Phosphat, der Hefe entstammend, und geringfügige Andeutung eines Reduktionsvermögens gegen Fehlingsche Mischung.

13. 20,0 ccm 10⁰/₀ige Lösung von Calciumsaccharosephosphat, mit Essigsäure neutralisiert,

2,0 g Hefe XII,

1,0 ccm Toluol.

Nach 2 Tagen: Magma von Calciumphosphat und im Filtrat davon saures Calciumphosphat sowie viel reduzierender Zucker.

14. 20,0 ccm 10⁰/₀ige Lösung von Calciumsaccharosephosphat, mit Essigsäure neutralisiert,

2,0 ccm H₂O,

1,0 ccm Toluol.

Selbst nach 9 Tagen keine Spaltung.

15. Die Hefenkontrolle entspricht dem Versuch 12.

Durch den gleichsinnigen Ausfall weiterer Versuche mit Oberhefen unter Verwendung von schwächer und stärker konzentrierten Lösungen der Saccharophosphate — in 3- und 10⁰/₀igen Lösungen —, auf deren Wiedergabe verzichtet werden kann, ist der enzymatische Charakter der Reaktion außer jeden Zweifel gestellt.

B. Zerlegung der Saccharophosphate durch frische Unterhefe in Gegenwart von Toluol bei 25⁰ und 37⁰.

Temperatur 25⁰.

16. 20,0 ccm 10⁰/₀ige Lösung von saccharophosphorsaurem Natrium, schwach alkalisch reagierend,
2,0 g Hefe U,
1,0 ccm Toluol.

Die Toluolmenge reichte nicht aus, die Gärwirkung der sehr kräftigen Unterhefe U zu unterdrücken; infolgedessen trat bald eine regelmäßige Kohlendioxydentwicklung ein.

Nach 24 Stunden: In der klar filtrierte Flüssigkeit war freies Phosphat mit Magnesiamischung und reduzierender Zucker mit Fehlingscher Lösung nachweisbar.

Nach 48 Stunden: Es fielen beide Proben noch stärker aus.

17. 20,0 ccm H₂O,
2,0 g Hefe U,
1,0 ccm Toluol.

Nach 24 Stunden: Spuren von Phosphat, aber kein reduzierender Zucker in Lösung.

Nach 48 Stunden: Das gleiche Ergebnis.

Temperatur 37⁰.

18. 20,0 ccm 5⁰/₀ige Lösung von schwach alkalisch reagierendem Natriumsaccharosephosphat,
2,0 g Hefe,
2,0 ccm Toluol.

Die größere Toluolmenge verhinderte bei der geringeren Konzentration an gärbare Substanz fast völlig die Entbindung von Kohlensäure.

Nach 48 Stunden: Die filtrierte Flüssigkeit enthält reichlich freies Phosphat und reduzierenden Zucker.

19. 20,0 ccm H₂O,
2,0 g Hefe U,
2,0 ccm Toluol.

Nach 48 Stunden: Im klaren Filtrat erzeugte Magnesia-
mischung einen geringen Niederschlag; Fehlingsche Lösung
wurde nicht reduziert.

Demnach ist Saccharophosphatase auch in Unter-
hefe vorhanden; sie wirkt auf 5- und 10%ige Lösungen
des rohrzuckerphosphorsauren Natriums bei 25° so-
wie 37°.

Aus den Unterhefen tritt bei der Digestion sehr viel mehr Eiweiß aus
als aus den Oberhefen. Es empfiehlt sich daher, das zu untersuchende
Gemisch im Wasserbade einige Minuten zu kochen. Dabei koaguliert
das Eiweiß so vollkommen, daß keine störenden Mengen mehr in das
klare Filtrat übergehen. Ausdrücklich haben wir uns davon überzeugt,
daß bei der in Gärungsansätzen sich einstellenden natürlichen Acidität
des Milieus keine Abspaltung von Phosphaten aus dem Estersalz des
Rohrzuckers erfolgt.

C. Wirkung der Saccharophosphatase bei schwach saurer Reaktion.

Aus den bisher mitgeteilten Versuchsprotokollen geht her-
vor, daß die Saccharophosphatase bei neutraler sowie bei schwach
alkalischer Reaktion wirkt (vgl. auch später S. 404). Da die
Rohrzuckerphosphorsäure in essigsaurer Lösung hinreichend
beständig ist, konnte wenigstens bei 25° die Wirksamkeit des
Ferments bei essigsaurer Reaktion geprüft und festgestellt
werden.

Zur Verwendung gelangte eine 5%ige Lösung des Natrium-
saccharophosphats, die mit Essigsäure bis zur gerade deutlich
sauren Reaktion auf Lackmus und Phenolphthalein versetzt war.

Temperatur 25°.

20. 20,0 ccm 5%ige essigsaurer Lösung von saccharose-
phosphorsaurem Natrium,
2,0 g Hefe OM,
1,0 ccm Toluol.

Nach 24 und 48 Stunden: Im klaren Filtrat kräftiger
Niederschlag mit Magnesiainmischung und starke Zuckerreaktion.

21. 20,0 ccm 5%ige essigsaurer Lösung von saccharose-
phosphorsaurem Natrium,
2,0 ccm H₂O,
1,0 ccm Toluol.

Nach 24 und 48 Stunden: Keine Magnesiafällung, aber ein wenig reduzierender Zucker.

Dieses Verhalten entspricht ganz der früher von Neuberg und Pollak¹⁾ gemachten Erfahrung, daß in der Rohrzuckerphosphorsäure die Esterbindung der Phosphorsäure gegen verdünnte Säuren viel beständiger ist als die ätherartige Verknüpfung der Zuckerreste untereinander.

22. 20,0 ccm H_2O , schwach mit Essigsäure angesäuert,
2,0 g Hefe OM,
1,0 ccm Toluol.

Nach 24 Stunden: Abgabe von Spuren freien Phosphats, aber Fehlen von Zucker.

Nach 48 Stunden: Das gleiche Verhalten.

Die Saccharophosphatase ist demnach auch bei essigsaurer Reaktion in typischer Weise wirksam.

Es folgen nunmehr

D. Quantitative Versuche über den Umfang der Saccharophosphatasewirkung.

Zu diesem Zwecke wurden die nachstehenden Ansätze angestellt:

- α) 100,0 ccm 5⁰/₁₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium, schwach alkalisch reagierend,
10,0 g Hefe XII,
5,0 ccm Toluol.
- β) 100,0 ccm 5⁰/₁₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium, mit Essigsäure gegen Lackmus neutralisiert,
10,0 g Hefe XII,
5,0 ccm Toluol.
- γ) 100,0 ccm H_2O ,
10,0 g Hefe XII,
5,0 ccm Toluol.
- δ) 100,0 ccm 5⁰/₁₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium, schwach alkalisch reagierend,
10,0 ccm H_2O ,
5,0 ccm Toluol.

¹⁾ l. c.

- ε) 100,0 ccm 5⁰/₁₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium, mit Essigsäure neutralisiert,
 10,0 ccm H₂O,
 5,0 ccm Toluol.

Sämtliche Mischungen wurden 1 Woche im Brutschrank bei 37° in Glasstöpselflaschen aufbewahrt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurden die hefehaltigen Proben klar filtriert, und dann wurde in einem aliquoten Teile aller Ansätze das in Freiheit gesetzte Phosphat durch Fällung mit Magnesiamixtur in zwei Kontrollbestimmungen in üblicher Weise ermittelt. Da in den Lösungen Dinatriumphosphat zugegen war, wurde eine Reihe von weiteren Doppelkontrollbestimmungen in der Art ausgeführt, daß überall zuvor erst mit Essigsäure angesäuert und dann mit Ammoniak alkalisiert wurde. Die Werte, die in den nachstehenden kleinen Tabellen vereinigt sind, zeigen aber, daß zwischen beiden Gruppen keine in Betracht kommenden Unterschiede bestehen¹⁾. In den ohne Hefe digerierten Proben δ und ε trat keine Spur anorganisches Phosphat auf.

Die Berechnung ist auf P und P₂O₅ für die ganze vorhandene Flüssigkeitsmenge erfolgt.

a) Direkte Magnesiafällung:

	α	β	γ	δ	ε
P =	0,2061	0,2165	0,0374	—	—
P ₂ O ₅ =	0,4721	0,4958	0,0856	—	—

b) Magnesiafällung nach vorheriger Ansäuerung mit Essigsäure und nachfolgender Alkalisierung mit Ammoniak:

	α	β	γ	δ	ε
P =	0,2159	0,2175	0,0367	—	—
P ₂ O ₅ =	0,4944	0,4981	0,0840	—	—

In jeder der verwendeten Lösungen von saccharosephosphorsaurem Natrium (rund 5⁰/₁₀igem Saccharophosphat, das in

¹⁾ Wie schon zuvor (S. 399) erwähnt ist, geht aus den obergärigen Hefen nur eine unbedeutende Menge Eiweiß in Lösung. Demgemäß hat sich auch ergeben, daß eine Reinigung des niedergeschlagenen Ammoniummagnesiumphosphats durch Umfällung unnötig ist.

lufttrockenem Zustande 2,25% H_2O enthielt), waren nach direkter Bestimmung 0,3131 g P = 0,7171 g P_2O_5 enthalten, so daß die Verbindung zu rund 60% durch die Saccharophosphatase hydrolysiert worden ist.

E. Über den Verlauf und die Geschwindigkeit der Saccharophosphatasewirkung.

Um über den Gang der Phosphatabspaltung aus dem saccharophosphorsäuren Natrium Näheres zu erfahren, wurde ein größerer Ansatz angestellt und in aliquoten Anteilen das freigewordene Alkaliphosphat nach Ablauf von 24, 48, 72 und 120 Stunden sowie nach acht Tagen ermittelt.

Zu den Versuchen diente folgende Mischung:

20,0 g festes saccharosephosphorsaures Natrium,
schwach alkalisch reagierend, aufgefüllt mit
 H_2O zum Volumen von
400,0 ccm, unter Zugabe von
20,0 g Hefe OM und
20,0 ccm Toluol.

Der Ansatz wurde im Brutschrank bei 37° aufbewahrt, und nach den angegebenen Zeiten wurden nach gutem Umschütteln Proben zur Bestimmung des frei gewordenen Phosphats klar abfiltriert.

Während in 10,0 ccm der Ausgangslösung (460,0 ccm) 0,0663 g Gesamt- P_2O_5 enthalten waren, ergab sich in je zwei gut übereinstimmenden Kontrollanalysen¹⁾ die Menge des abgespaltenen anorganischen Phosphats:

nach 24 Stunden für 10,0 ccm Lösung zu	0,0258 g P_2O_5 = 38,9%
" 48 " " 10,0 " " "	0,0344 " P_2O_5 = 51,9%
" 72 " " 10,0 " " "	0,0385 " P_2O_5 = 58,1%
" 120 " " 10,0 " " "	0,0428 " P_2O_5 = 64,6%
" 8 Tagen " 10,0 " " "	0,0442 " P_2O_5 = 66,7%

Demnach sind zum Schlusse wiederum rund $\frac{2}{3}$ des Saccharophosphats enzymatisch zerlegt worden, in gutem Einklange mit den früher (S. 400 bis 401) beschriebenen Versuchen, zu denen die Oberhefe XII gedient hatte. Der verbliebene ungespaltene

¹⁾ Diese Hefe gab für sich so wenig lösliches Phosphat ab, daß dessen Quantität vernachlässigt werden kann.

Rest wird offenbar nur ziemlich langsam (vgl. S. 405) hydrolysiert, ein Verhalten, das auch von vielen anderen Fermentreaktionen her bekannt ist.

Die nachstehende kurvenmäßige Darstellung, in der die Zeiten als Ordinate und die in Freiheit gesetzten prozentischen P_2O_5 -Mengen als Abszisse aufgetragen sind, ergibt ein Bild vom Verlaufe der Saccharophosphatasewirkung.

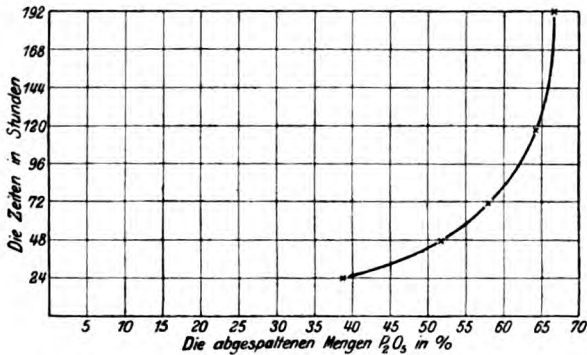


Fig. 1.

F. Über die Änderungen des Drehungsvermögens von Saccharophosphatlösungen bei Einwirkung von Hefe.

Als Estersäure des Rohrzuckers besitzt die Saccharosephosphorsäure ein Drehungsvermögen. Ihr hier benutztes Natriumsalz dreht stark nach rechts.

Für die etwa 5⁰/₁₀ige Lösung fanden wir 1 Stunde nach der Auflösung und konstant während 46 Stunden

$$[\alpha]_{D_{15}} = + 48,01^{\circ}$$

$$(\alpha = + 2,50^{\circ}, l = 1, c = 5,207).$$

Zur Bestimmung der Drehungsänderungen ist die Benutzung eines bei Auerlicht arbeitenden [auf Prozente Traubenzucker geeichten Polarisationsapparates mit feiner Teilung¹⁾] bequemer. In ihm zeigt diese 5,207⁰/₁₀ige Lösung im 2-cm-Rohr eine Drehung entsprechend einem Gehalt von 4,68⁰/₁₀ Glucose.

Aus der Reihe unserer Versuchsprotokolle möge die Ausführung der folgenden genügen. Bemerkt sei, daß hierbei die Temperatur 32⁰ betragen hat.

¹⁾ nach C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 102, 1914.

- α) 100,0 ccm 5⁰/₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium, schwach alkalisch reagierend,
10,0 g Hefe XII,
5,0 ccm Toluol.

Die nach den angegebenen Zeiten entnommenen Proben der gut durchgeschüttelten Mischung filtrierten durch das erwähnte Filtrierpapier sofort völlig klar.

Anfangsdrehung: entspr. + 2,15⁰/₀ Glucose im 1-dcm-Rohr,
nach 2 St.: " + 1,85⁰/₀ " " " " ,
" 6 " : " + 1,60⁰/₀ " " " " ,
" 24 " : " + 0,98⁰/₀ " " " " .

Am Schlusse reagierte die durch Aufkochen von gelösten Gasen befreite Flüssigkeit deutlich alkalisch auf Lackmus, auch rötete sie gerade Phenolphthalein.

- β) 100,0 ccm 5⁰/₀ige Lösung von saccharophosphorsaurem Natrium, mit Essigsäure neutralisiert,
10,0 g Hefe XII,
5,0 ccm Toluol.

Anfangsdrehung: entspr. + 2,02⁰/₀ Glucose im 1-dcm-Rohr,
nach 2 St.: " + 1,78⁰/₀ " " " " ,
" 6 " : " + 1,51⁰/₀ " " " " ,
" 24 " : " + 0,97⁰/₀ " " " " .

Die Endlösung reagierte auf die Indicatoren neutral.

- γ) 100,0 ccm H₂O,
10,0 g Hefe XII,
5,0 ccm Toluol.

Anfangsdrehung: entspr. + 0,00⁰/₀ Glucose im 1-dcm-Rohr,
nach 2 St.: " + 0,00⁰/₀ " " " " ,
" 6 " : " + 0,00⁰/₀ " " " " ,
" 24 " : " + 0,08⁰/₀ " " " " .

Diese geringe Drehung rührt von in Lösung gegangenen Hefenbestandteilen her.

Über längere Zeit erstreckte sich der Versuch:

- δ) 200,0 ccm 5⁰/₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium, schwach alkalisch reagierend,
 20,0 g Hefe OM,
 10,0 ccm Toluol.

Anfangsdrehung: entspr. + 4,18⁰/₀ Glucose im 2-dcm-Rohr,

nach 1 Tag:	"	+ 2,36 ⁰ / ₀	"	"	"	"	"
" 3 Tagen:	"	+ 1,62 ⁰ / ₀	"	"	"	"	"
" 5 "	"	+ 1,38 ⁰ / ₀	"	"	"	"	"
" 9 "	"	+ 1,39 ⁰ / ₀	"	"	"	"	"
" 41 "	"	- 0,02 ⁰ / ₀	"	"	"	"	"

Zur Kontrolle diente der Ansatz

- ε) 200,0 ccm H₂O,
 20,0 g Hefe OM,
 10,0 ccm Toluol.

Anfangsdrehung: 0,00,

nach 1 Tag:		0,00,					
" 3 Tagen:	entspr.	+ 0,05 ⁰ / ₀	Glucose	im	2-dcm-Rohr,		
" " 25 "	"	- 0,94 ⁰ / ₀	"	"	"	"	"
" " 41 "	"	- 0,92 ⁰ / ₀	"	"	"	"	"

Wie zuvor dargelegt ist, gehen Phosphatloslösung und Rohrzuckerhydrolyse bei der Einwirkung von Hefe auf die Saccharophosphate nebeneinander her. Dementsprechend ist auch der jeweils abgelesene Drehungswert ein Ausdruck für die Übereinanderlagerung beider Fermentreaktionen.

Die Endzahl des obigen Versuches δ läßt erkennen, daß es jedenfalls auch nach 41 Tagen zu keiner vollständigen Spaltung der Rohrzuckerphosphorsäure in Trauben- und Fruchtzucker sowie in Phosphat gekommen ist. Denn in diesem Falle müßte die Lösung nur Invertzucker enthalten und infolgedessen stark lävogyr sein. Tatsächlich ist aber die Linksdrehung nur ganz gering, und die Kontrolle ε mit der für sich digerierten Hefe lehrt, daß schon infolge der ausgedehnten Hefenautolyse unter sonst gleichen Bedingungen linksdrehende Stoffe in Lösung gehen. Wenn trotzdem die Enddrehung nur auf wenig unter 0 gesunken ist, so ergibt sich bereits daraus, daß unzerlegter Phosphorsäureester übrig geblieben sein muß. Dementsprechend enthält

auch die 41 Tage der Hefeeinwirkung ausgesetzte Lösung des saccharosephosphorsauren Natriums noch organisch gebundenen Phosphor. Die direkte Bestimmung desselben — nach Ausfällung der anorganischen Phosphate mittels Magnesiamischung — ergab, daß rund 27% der Estersäure dem Zerfall widerstanden haben.

G. Die alkoholische Gärung der Saccharophosphate.

Da Hefe die Phosphatabspaltung aus den Salzen der Rohrzuckerphosphorsäure, wie aus den gemachten Angaben hervorgeht, unter den verschiedensten Bedingungen zuwege bringt und scheinbar gleichzeitig die vorhandene Invertase auf den Rohrzuckeranteil einwirkt, so ist die Vergärbarkeit der Saccharophosphate zu erwarten.

Tatsächlich geraten sie mit frischen Ober- und Unterhefen sowie mit dem Macerationssaft aus letzteren in Gärung. Allerdings beginnt — namentlich bei niedriger Temperatur (22°) — die Gärung zumeist viel langsamer und bleibt leichter unvollständig als die von Rohrzucker. Das ist auch der Grund, warum vor 7 Jahren die gelegentliche Prüfung mit käuflicher Bierhefe (C. Neuberg und H. Pollak, l. c.) negativ ausfiel; vielleicht war hier eine besonders invertinarme Hefe benutzt worden, auch wissen wir bisher nichts über etwaige Schwankungen des Saccharophosphatasegehaltes in den Hefen.

Folgendes wurde festgestellt:

Temperatur 22°.

1. 100,0 ccm 4,7%ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium¹⁾,

5,0 g Hefe XII.

Beginn der CO₂-Entwicklung nach 4 $\frac{1}{2}$ Stunden.

2. 100,0 ccm 3,4%ige Lösung von Rohrzucker¹⁾,

5,0 g Hefe XII.

Nach 40 Minuten ist kräftige Gärung im Gange.

¹⁾ In 466 g saccharosephosphorsaurem Natrium sind 342 g Rohrzucker enthalten.

Temperatur 25°.

3. 20,0 ccm 5⁰/₁₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium,
2,0 g Hefe U.

Nach 40 Stunden ist das Gärröhrchen völlig mit CO₂ angefüllt; die Gasentwicklung ist zu Ende gekommen. Filtriert man von der abgesetzten Hefe ab, so findet man im Filtrat reichlich anorganisches Phosphat, aber auch reduzierenden Zucker.

4. 20,0 ccm 5⁰/₁₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Calcium,
2,0 g Hefe U.

Nach 40 Stunden ausgegoren; phosphorsaurer Kalk schwimmt auf dem Hefesatz als schaumig-gallertige Masse.

5. 20,0 ccm H₂O,
2,0 g Hefe U.

Nach 40 Stunden: Keine CO₂-Entwicklung; im Filtrat der Hefeaufschwemmung keine Zuckerreaktionen, Spuren von Phosphat.

Temperatur 28°.

6. 20,0 ccm 10⁰/₁₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium, schwach alkalisch reagierend,
2,0 g Hefe OM.

Nach 20 Stunden: 8,0 ccm CO₂ im Schrötterschen Gärröhrchen.

In der filtrierten Flüssigkeit sind anorganisches Phosphat und reduzierender Zucker vorhanden.

7. 20,0 ccm 10⁰/₁₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium, mit Essigsäure neutralisiert,
2,0 g Hefe OM.

Nach 20 Stunden: 8,0 CO₂ entwickelt, anorganisches Phosphat und reduzierender Zucker in Lösung.

8. 20,0 ccm H₂O,
2,0 g Hefe OM.

Nach 20 Stunden: 0,25 ccm CO₂, Spuren Phosphat, aber kein Zucker abgegeben.

9. 20,0 ccm 10⁰/₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Calcium, schwach alkalisch reagierend, 2,0 g Hefe OM.

Nach 20 Stunden: 11,5 ccm CO₂.

10. 20,0 ccm 10⁰/₀ige Lösung von saccharosephosphorsaurem Calcium, mit Essigsäure neutralisiert, 2,0 g Hefe OM.

Nach 20 Stunden: 11,0 ccm CO₂.

11. Hefenkontrolle = Nr. 8.

Die Versuche zeigen, daß die Saccharophosphate durch frische Hefen vergoren werden.

In einem größeren Ansatz ist der entstandene Äthylalkohol besonders nachgewiesen worden. Die Gärung ist aber deutlich schwächer als die von reinen Zuckerlösungen entsprechender Konzentration. Um eine Hemmung der Gärung durch die Hydroxylionen¹⁾, an die wir zuerst dachten, kann es sich nicht handeln, da sie auch in den von vornherein mit Essigsäure neutralisierten Ansätzen zutage trat. Vielleicht macht sich eine Schädigung durch das Phosphation geltend, das entgegen den von Harden und Young geäußerten Anschauungen keineswegs stets gärungsfördernd und -beschleunigend wirkt²⁾. Damit jedoch nicht völlig im Einklange steht der Umstand, daß verdünntere Lösungen noch langsamer angegriffen werden können. Jedenfalls erhielten wir mehrfach diese Resultate in einer Reihe von Versuchen, die nebst weiteren Einzelheiten über die Vergärung später mitgeteilt werden sollen.

Dem gegenüber setzt die zellfreie Vergärung der Saccharophosphate mit bemerkenswerter Schnelligkeit ein.

Temperatur 25°.

12. 35,0 ccm Hefemacerationssaft aus Münchener Unterhefe, 4,7 g saccharosephosphorsaures Natrium³⁾, 2,0 ccm Toluol.

¹⁾ Vgl. C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. 78, 238, 1916.

²⁾ E. Buchner und J. Meisenheimer, Ber. 43, 1795, 1910.

³⁾ Beim Umschütteln lösen sich die festen Saccharophosphate leicht im Hefensaft.

Beginn der regelmäßigen Gärung nach 25 Minuten. Die Kohlensäure steigt in einem Strome feiner Blasen auf, sie sind etwas kleiner als die bei der Rohrzuckerkontrolle (Versuch 14), was wohl auf andere Viscositäts- und Sättigungsverhältnisse zurückzuführen ist. Die Kohlendioxydentwicklung hält mehrere Tage an.

13. 35,0 ccm Hefemacerationssaft,
4,6 g saccharosephosphorsaures Calcium,
2,0 ccm Toluol.

Beginn der Gärung schon nach 15 Minuten.

Allem Anscheine nach hemmt das abgespaltene Calciumphosphat, das übrigens in dem dicklichen Hefensaft lange Zeit gelöst bleibt, weniger als das Dinatriumphosphat, das bei Versuch 12 primär entsteht.

14. 35,0 ccm Hefemacerationssaft,
3,4 g Rohrzucker,
2,0 ccm Toluol.

Nach 15 Minuten ist die Gärung im Gange.

Die Ansätze 12 und 14 dienten zugleich der Orientierung darüber, in welchem Grade das saccharosephosphorsaure Natrium (Versuch 12) durch die Fermente des Hefemacerationssaftes gespalten wird. Da der Hefensaft an sich anorganische wie organische Phosphorverbindungen enthält, ermöglichte der Vergleich mit der Rohrzuckerkontrolle (Versuch 14) eine Feststellung.

Zu diesem Zwecke wurde der Versuch nach genau 70 Stunden unterbrochen; bei längerer Ausdehnung wäre fast alles in den Säften enthaltene Eiweiß durch die Hefentryptase verdaut und unkoagulierbar gemacht worden. So aber konnte noch die Hauptmenge durch Hitzegerinnung entfernt werden.

Die Gärgemische wurden in Meßkolben mit je 100 ccm Wasser verdünnt und $\frac{1}{4}$ Stunde auf dem siedenden Wasserbade belassen. Dabei flockte das Eiweiß gut aus; alsdann wurde auf 200,0 ccm aufgefüllt.

Die filtrierten Lösungen waren völlig klar und hellgelb. Die Flüssigkeit aus Versuch 12 drehte im 2-dcm-Rohr links entsprechend einem Gehalt von $-1,30\%$ Glucose, die Flüssigkeit aus Versuch 14 drehte entsprechend $-0,10\%$ Glucose.

Verriet sich schon dadurch ein größerer Gehalt an nicht vergorener Substanz im Saccharophosphatversuche, so bestätigte der Ausfall der direkten Reduktionsproben dieses Ergebnis. Um sie anstellen zu können, war eine Befreiung des Gärgutes von den störenden stickstoffhaltigen Produkten nach den Angaben von Neuberg und Ishida¹⁾ mittels Mercuriacetat und Phosphorwolframsäure erforderlich; denn schon Buchner²⁾ hat angegeben, daß der Zuckernachweis in gärtätig gewesenen Hefesäften sonst kaum ausführbar ist.

Nach erfolgter Reinigung zeigte Lösung 14 eine schwache, Lösung 12 eine gewaltige Einwirkung auf Fehlingsche Mischung.

Die Bestimmungen des anorganischen Phosphats³⁾ hatten folgendes Ergebnis:

In der gesamten Lösung 12 waren 0,6352 g P_2O_5 ,
 " " " " 14 " 0,3112 " P_2O_5
 vorhanden. Daraus ergibt sich der P_2O_5 -Überschuß in 12 zu 0,3240 g und die enzymatische Phosphatspaltung aus dem Saccharophosphat durch Macerationssaft zu etwa 45,5⁰/₀.

Temperatur 32°.

Eine Versuchsreihe mit Macerationssaft aus untergäriger Berliner Hefe K ergab gleichfalls, daß die Saccharophosphate vergoren werden; auch hier setzte die Kohlendioxydentwicklung nur unbedeutend später ein als in den Rohrzuckerkontrollen von entsprechender Konzentration.

Somit zeigen die Gärversuche in ihrer Gesamtheit, daß gärkräftige Hefen und Macerationssäfte aus untergärigen Hefen alkoholische Gärung der Saccharophosphate bewirken.

Zusammenfassung.

Die Saccharophosphate, die Salze der Rohrzuckerphosphorsäure, die durch künstliche Phosphorylierung der Saccharose gewonnen wird, können als „körperfremd“ gelten.

¹⁾ C. Neuberg u. M. Ishida, diese Zeitschr. 37, 142, 1912.

²⁾ Zymasegärung S. 211/212.

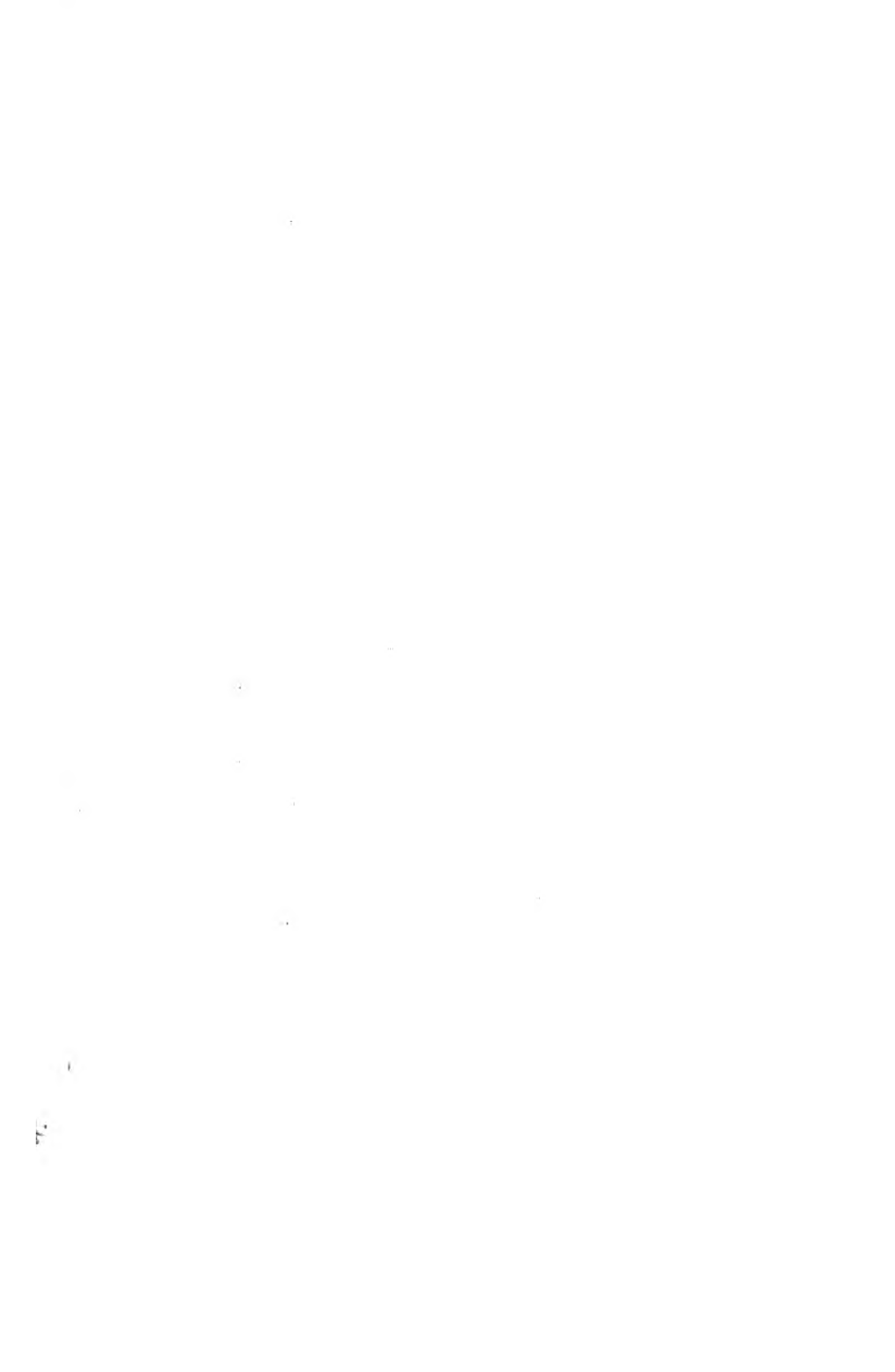
³⁾ Nicht berücksichtigt sind die Fehler, die durch den Gehalt des Hefesaftes an löslichen Kalksalzen sowie etwaige Ausfällung von unlöslichem Calciumphosphat entstehen können. Sie dürften nicht groß sein, bzw. durch die Kontrolle ausgeglichen werden, da ja auch in dem Rohrzucker Versuch aus dem Saft allein stammend Calcium- und Phosphationen vorhanden sind.

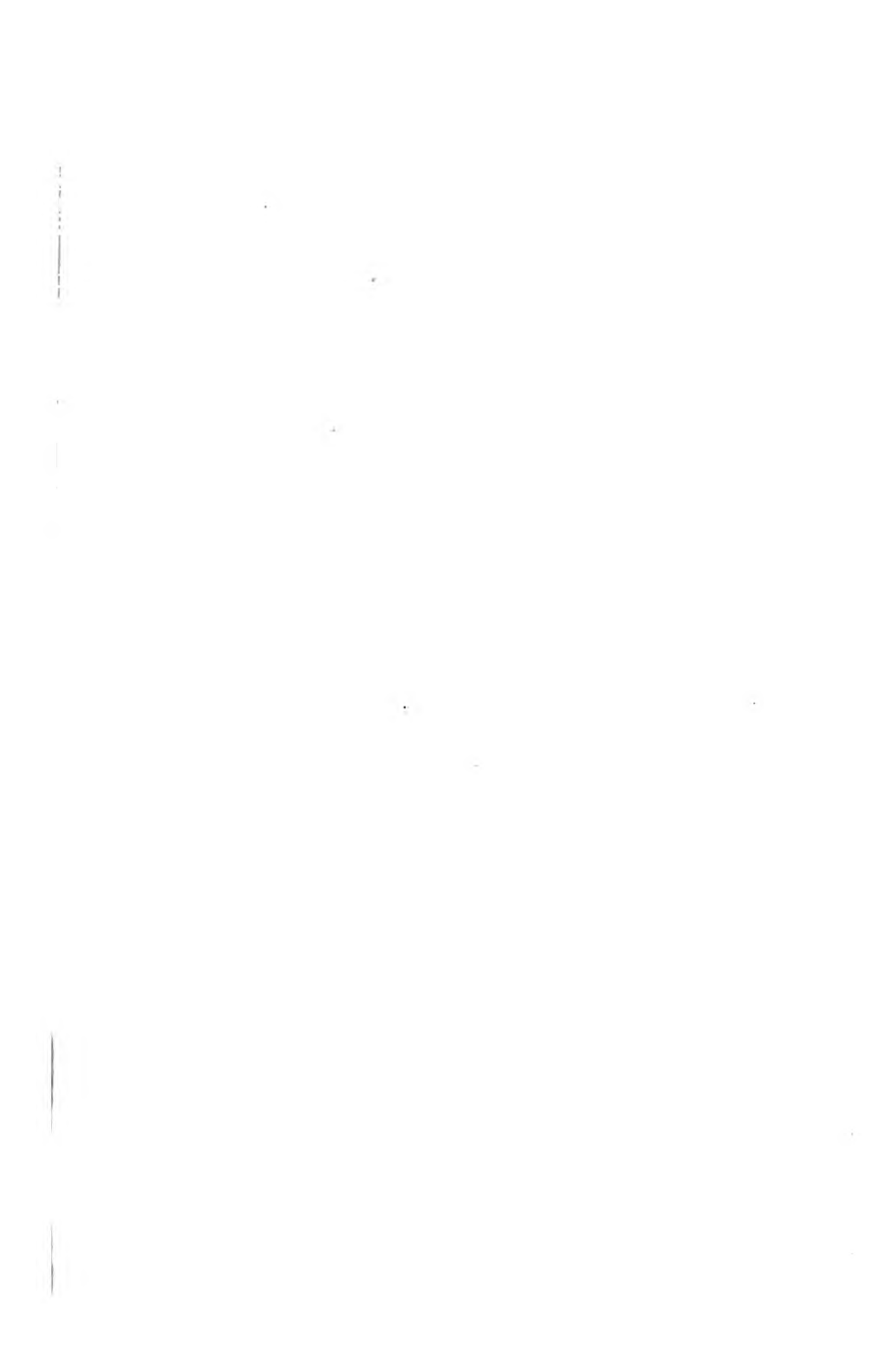
Trotzdem werden sie durch ein in den Hefen vorhandenes Ferment, die Saccharophosphatase, zerlegt. Die Saccharophosphatase spaltet anorganisches Phosphat ab. Sie findet sich in ober- und untergärenden Hefen. Sie wirkt in Gegenwart von Antiseptics sowohl bei Verwendung von frischen Hefen als von Macerationssäften. Diese sowie lebende Hefen rufen alkoholische Gärung in den Saccharophosphatlösungen hervor, indem neben dem phosphatablösenden Agens Invertin und Zymase in Tätigkeit treten. Durch die Wirksamkeit in lebender Hefe ist die Saccharophosphatase von der schon bekannten Hexosediphosphatase unterschieden. Letztere ist bekanntlich außerstande, die Salze der Hexosediphosphorsäure anzugreifen, solange sie nicht in Form von Hefensaft von der lebenden Zelle abgetrennt ist, und zeigt eine Empfindlichkeit gegen Toluol, die der Saccharophosphatase fremd ist. Deshalb hat man die Saccharophosphatase als ein neues Enzym zu betrachten. Sie ist bei 22 bis 37° als wirksam befunden, und zwar bei neutraler, schwach alkalischer und schwach saurer (essigsaurer) Reaktion. Das leicht lösliche Natriumsalz der Rohrzuckerphosphorsäure wurde zu 67% durch frische Hefe und zu 45,5% durch Macerationssaft hydrolysiert. Bei Verwendung des ebenfalls leicht löslichen Kalksalzes der Estersäure (in 10%iger Lösung) kann man den Eintritt der fermentativen Spaltung mit bloßem Auge ohne weiteres daran erkennen, daß das in Freiheit gesetzte Calciumphosphat als eine starre Gallertmasse abgeschieden wird. Da die Saccharophosphate in neutraler und alkalischer Lösung vollständig und in schwach saurer hinreichend beständig sind, bilden sie ein sehr bequemes Substrat für das Studium dieser Fermentwirkung.

Autorenverzeichnis.

- Asher, Leon. Beiträge zur Physiologie der Drüsen. XXXI. S. 141.
- Berczeller, L. Die Oberflächenspannung von stereoisomeren Verbindungen. S. 1.
- Bokorny, Th. Weitere Versuche über die Trockensubstanzvermehrung der Hefe unter Anwendung von Harnstoff als Stickstoffquelle. S. 359.
- Boruttau, H. Beiträge zur Frage: Wie wird pflanzliches Eiweiß der Nahrung im Tierkörper verwertet? II. S. 96.
- Über das Verhalten von Ergänzungsnährstoffen. I. S. 103.
- Buchner, Eduard, und Siegfried Skraup. Extraktionsversuche mit verschiedenen Trockenhefen. S. 107.
- Wirkung von Toluol auf die Gärungsvorgänge. S. 134.
- Djenab, Kemal, und Carl Neuberg. Über die Saccharophosphatase der Hefen und die Vergärung der Rohrzuckerphosphorsäure. S. 391.
- Dubois, Marcel. Über das Zusammenwirken von Milz, Schilddrüse und Knochenmark. S. 141.
- Ducháček, F. Über Bacillus paralacticus. S. 31.
- Hári, Paul. Beiträge zur Lichtabsorption des Oxyhämoglobins. S. 229.
- Hasselbalch, K. A. Wasserstoffzahl und Sauerstoffbindung des Blutes. S. 282.
- Helwig, Dr. Eine neue Methode zur Prüfung der Phagocytose. S. 226.
- Herzfeld, E., und R. Klinger. Studien zur Chemie und Physiologie der Blutgerinnung. III. S. 289.
- Höber, Rudolf. Der Begriff „Nährwert“. S. 68.
- Joachimowitz, Marianne. Ein neues Reagens auf Phloroglucin, Catechin und ihre Derivate, sowie über die Verbreitung derselben im Pflanzenreiche. S. 324.
- Kende, Siegmund. Die Wirkung der Seifen auf den fermentativen Abbau der Stärke und des Glykogens. S. 9.
- Kjöllerfeldt, Marcus. Untersuchungen über die Permeabilität der Zellen. VII. Untersuchungen über die Resorption des Eiweißes und einiger seiner Abbauprodukte in der Bauchhöhle des Kaninchens. S. 188.
- Laurin, Eric. Ergotoxin und Adrenalinhyperglykämie. S. 87.
- Loewit, M. Anaphylaxiestudien. Ein Anaphylatoxin pflanzlichen Ursprungs. S. 72.
- Neuberg, Carl, siehe Djenab.
- Salkowski, E. Notiz über Vorläufer der Methode von Kjeldahl zur Bestimmung des Stickstoffs. S. 60.
- Zur Frage der Säurewirkung beim Pflanzenfresser und Fleischfresser. S. 64.
- Skraup, Siegfried, siehe Buchner.
- Stoklasa, Julius. Die physiologische Bedeutung des Kaliums in der Pflanze. S. 310.
- Straub, Walther. Über die Entwicklung der typischen Blattglykoside in der keimenden und wachsenden Digitalispflanze. S. 48.

74 574.
E. N. Gf.





Princeton University Library



32101 079671531

