

# PRAKTIKUM DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE

Peter Rona

 Springer

**PRAKTIKUM  
DER PHYSIOLOGISCHEN  
CHEMIE**

VON

**PETER RONA**

ERSTER TEIL.

**FERMENTMETHODEN**

MIT 73 TEXTABBILDUNGEN



SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG GMBH

1926

ISBN 978-3-662-23171-5 ISBN 978-3-662-25160-7 (eBook)  
DOI 10.1007/978-3-662-25160-7

ALLE RECHTE, INSBESONDERE DAS DER ÜBERSETZUNG  
IN FREMDE SPRACHEN, VORBEHALTEN.

COPYRIGHT 1926 BY SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG  
URSPRÜNGLICH ERSCHIENEN BEI JULIUS SPRINGER IN BERLIN 1926  
SOFTCOVER REPRINT OF THE HARDCOVER 1ST EDITION 1926

**MEINEM LIEBEN FREUNDE  
LEONOR MICHAELIS  
GEWIDMET**

## Vorwort.

Das vorliegende Buch verfolgt lediglich praktische Zwecke. Es soll ein kurzer Wegweiser bei der Arbeit mit Fermenten sein. Ausführungen über Eigenschaften und Vorkommen der Fermente, über Systematik u. dgl. konnten unterbleiben, da wir ausgezeichnete Handbücher besitzen, die über alle diese Fragen genügend unterrichten. Die methodischen Vorschriften wurden hingegen so ausführlich mitgeteilt, daß man nach ihnen arbeiten kann. Es wurde auch versucht, alle zu der Ausführung der betreffenden Untersuchungen nötigen Angaben, trotz der gebotenen Kürze, in dem Buche selbst zu bringen. Rein chemische und physikalisch-chemische Methoden sind gleicherweise berücksichtigt. Eine vollständige Aufzählung aller in Betracht kommenden Methoden war natürlich nicht möglich; sie wurde auch nicht beabsichtigt. Bei der Fülle des Materials ist es jedoch wahrscheinlich, daß die eine oder andere Methode, die wohl hätte Platz finden müssen, übersehen worden ist.

Bei der Sammlung und Sichtung des Materials leistete mir Herr Dr. med. K. Meyer sehr wertvolle Hilfe. Bei der Korrektur waren mir die Herren Dr. W. Deutsch, H. Kleinmann, H. Weber und besonders die Herren Dr. E. Mislowitzer und H. Nicolai behilflich. Die Abbildungen auf Seite 17, 34, 36, 272 verdanke ich Herrn cand. chem. R. Ammon.

Allen diesen Herren sage ich meinen aufrichtigsten Dank.

Berlin, April 1926.

**P. Rona.**

# Inhaltsverzeichnis.

## Allgemeiner Teil.

	Seite
Allgemeines über Darstellung der Fermente . . . . .	1
Auswählende Adsorption und Elution . . . . .	3
Dialyse und Filtration . . . . .	4
Dialysiermembranen . . . . .	4
Kollodiumdialysierschlauch nach L. Michaelis . . . . .	6
Kollodiumdialysierschlauch nach P. Trendelenburg . . . . .	6
Ultrafilter nach W. Ostwald . . . . .	9
Eintauchfilter nach Giemsa . . . . .	10
Elektrodialyse . . . . .	12
Nach W. Pauli . . . . .	12
Nach H. Freundlich und L. Farmer-Loeb. . . . .	13
Konservierung . . . . .	14
Nachweis und Messung der Fermentwirkungen . . . . .	14
Das Reihenprinzip . . . . .	14
Chemische Methoden . . . . .	16
Physikalische Methoden . . . . .	16
Polarimetrie . . . . .	16
Refraktometrie . . . . .	22
Interferometrie . . . . .	28
Nephelometrie . . . . .	30
Nephelometer nach H. Kleinmann . . . . .	31
Colorimetrie . . . . .	34
Colorimeter nach Duboscq . . . . .	34
Chromophotometer nach Plesch . . . . .	36
Konduktometrie . . . . .	38
Kinetische Messungen . . . . .	42
Beziehungen zwischen Umsatz und Zeit . . . . .	42
Beziehungen zwischen Umsatz und Temperatur . . . . .	46
Beziehungen zwischen Umsatz und Acidität . . . . .	47
Beziehungen zwischen Umsatz und Substratmenge . . . . .	47
Enzymmaße und Einheiten . . . . .	51
Beeinflussung von Fermentwirkungen durch Änderung der äußeren Bedingungen . . . . .	52
Temperatureinfluß . . . . .	52
Die Wasserstoffionenkonzentration . . . . .	53
Puffermischungen . . . . .	54
Bestimmung der $[H^+]$ mittels Indicatoren . . . . .	58
Nach S. P. Sørensen . . . . .	58
Nach L. Michaelis . . . . .	60

	Seite
Bestimmung der $[H^+]$ mittels Gasketten . . . . .	62
Nach L. Michaelis . . . . .	67
Mit dem Potentiometer nach E. Mislowitzer . . . . .	70
Die Elektroden . . . . .	72
Chinhydronelektrode . . . . .	76
Die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Fermente . . . . .	79
Aktivatoren und Paralytoren . . . . .	88
<b>Spezieller Teil.</b>	
Fettpaltende Fermente (Esterasen, Lipasen) . . . . .	89
Darstellung der Pankreaslipase . . . . .	89
Darstellung der Leberlipase . . . . .	93
Darstellung der Magenlipase . . . . .	94
Darstellung der Serumlipase . . . . .	95
Darstellung der Ricinuslipase . . . . .	96
Bestimmungsmethoden für die Lipasen. . . . .	96
Stalagmometrische Methode nach Rona und Michaelis . . . . .	96
Modifikation der Methode nach Willstätter und Memmen . . . . .	100
Titrimetrische Methode nach Willstätter . . . . .	100
Titrimetrische Methode nach Knaffl-Lenz . . . . .	102
Titrimetrische Methode nach Rona und Ammon . . . . .	103
Titrimetrische Methode nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz für Ricinuslipase . . . . .	105
Gasanalytische Methode nach Rona und Lasnitzki . . . . .	106
Andere Esterasen . . . . .	114
Phosphatasen . . . . .	114
Bestimmung des Phosphors nach H. Lieb . . . . .	116
Bestimmung des Phosphors nach G. Embden . . . . .	120
Glycerophosphatase . . . . .	121
Saccharophosphatase . . . . .	122
Sulfatase . . . . .	122
Kohlehydratpaltende Fermente . . . . .	123
Saccharase (Invertin) . . . . .	123
Darstellung nach Hudson und Willstätter und Racke . . . . .	124
Darstellung nach Euler und Josephson . . . . .	124
Darstellung nach Willstätter und Schneider . . . . .	126
Maße der Invertin-Konzentration . . . . .	132
Maße der Invertin-Menge . . . . .	134
Maltase . . . . .	135
Darstellung nach Willstätter und Mitarbeitern . . . . .	135
Trennung von Maltase und Saccharase nach Willstätter und Bamann . . . . .	136
Emulsin. . . . .	137
Darstellung nach Willstätter und Csányi . . . . .	137
Darstellung nach Helferich . . . . .	138
Lactase . . . . .	139
Darstellung nach Willstätter und Oppenheimer. . . . .	139

	Seite
Diastasen (Amylasen) . . . . .	140
Speichelamylase . . . . .	141
Pankreasamylase . . . . .	141
Darstellung nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse . . . . .	141
Trennung von Lipase und Trypsin . . . . .	142
Leberamylase . . . . .	143
Pflanzliche Amylasen . . . . .	144
Bestimmungsmethoden der kohlehydratspaltenden Fermente . . . . .	144
Bestimmung der Saccharase . . . . .	144
Glucosebestimmung nach Bertrand . . . . .	144
Glucosebestimmung nach Moeckel und Frank . . . . .	147
Glucosebestimmung nach L. Michaelis . . . . .	148
Tabellen für die Bertrand-Methode . . . . .	150
Glucosebestimmung nach Hagedorn-Jensen . . . . .	153
Glucosebestimmung nach Willstätter und Schübel . . . . .	155
Glucosebestimmung, polarimetrisch . . . . .	156
Glucosebestimmung, elektrometrisch nach E. Mislowitzer . . . . .	157
Bestimmung der Maltase . . . . .	162
Bestimmung des Emulsins . . . . .	163
Nach Willstätter und Csányi . . . . .	163
Nach Helferich . . . . .	165
Nach Josephson . . . . .	165
Nach Brunswik . . . . .	166
Bestimmung der Lactase . . . . .	168
Bestimmung der Amylase . . . . .	168
Nach Olsson . . . . .	169
Nach Wohlgemuth . . . . .	170
Nach Michaelis . . . . .	170
Nach Rona und van Eweyk . . . . .	172
Nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse . . . . .	174
Nach von Euler und Svanberg . . . . .	176
Nach Pringsheim und Gorodiski . . . . .	177
Nach Holmbergh . . . . .	177
Fermente der alkoholischen Gärung . . . . .	178
Darstellung von Hefepreßsaft nach Buchner . . . . .	178
Darstellung von Acetondauerhefe nach Buchner . . . . .	179
Darstellung von Trockenhefe und Hefesaft nach Lebedew . . . . .	180
Das Co-Enzym (Co-Zymase) . . . . .	182
Co-Zymase aus Muskelkochsaft nach Meyerhof . . . . .	183
Co-zymasefreie Hefe . . . . .	183
Bestimmung der Gärwirkung . . . . .	185
Nach Willstätter und Steibelt . . . . .	185
Nach Harden, Thomson und Young . . . . .	186
Nach Euler und Josephson . . . . .	187
Nach Warburg-Dorner und Meyerhof . . . . .	187
Darstellung der hexosephosphorsauren Salze . . . . .	188
Carboxylase . . . . .	191
Bestimmung des Acetaldehyds . . . . .	192



	Seite
Glykolyse . . . . .	194
Bestimmung der Milchsäure im Gewebe nach Fürth-Charnas, Ripper (modifiziert nach Hirsch-Kauffmann, Embden, Meyerhof) . . . . .	194
Bestimmung der Milchsäure im Gewebe nach Warburg . . . . .	198
Bestimmung der Glykolyse im Blut nach Rona und Wilenko . . . . .	211
Eiweißspaltende Fermente . . . . .	212
Pepsin . . . . .	212
Darstellung nach Pekelharing . . . . .	212
Darstellung nach Hammarsten . . . . .	213
Bestimmung nach Mett . . . . .	215
Bestimmung nach Grützner . . . . .	215
Bestimmung nach Volhard und Löhlein . . . . .	216
Bestimmung nach Fuld und Levisohn . . . . .	217
Bestimmung nach Ege . . . . .	218
Bestimmung nach Jacoby . . . . .	219
Bestimmung nach Michealis und Rothstein . . . . .	220
Bestimmung nach Gläßner . . . . .	221
Bestimmung nach Groß . . . . .	222
Bestimmung nach Sörensen . . . . .	222
Bestimmung nach Rona und Kleinmann . . . . .	224
Bestimmung nach Ege im Magensaft . . . . .	226
Bestimmung nach Hedin im Harn . . . . .	227
Lab, Chymosin . . . . .	228
Darstellung nach Wohlgemuth . . . . .	228
Darstellung nach Hammarsten . . . . .	228
Bestimmung nach Michaelis und Rothstein . . . . .	231
Bestimmung nach Rona und Gabbe . . . . .	232
Trypsin . . . . .	233
Darstellung nach Michaelis . . . . .	234
Darstellung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz . . . . .	234
Bestimmung nach Groß, Fuld, Michaelis . . . . .	236
Bestimmung nach Palitzsch und Walbum . . . . .	237
Bestimmung nach Northrop . . . . .	238
Bestimmung nach Sörensen . . . . .	241
Bestimmung nach van Slyke . . . . .	246
Bestimmung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz . . . . .	254
Bestimmung nach Willstätter und Persiel . . . . .	256
Bestimmung nach Rona und Kleinmann . . . . .	258
Enterokinase . . . . .	261
Trennung von Trypsin und Enterokinase nach Waldschmidt- Leitz . . . . .	262
Darstellung nach Waldschmidt-Leitz . . . . .	262
Bestimmung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz . . . . .	264
Erepsin . . . . .	265
Darstellung nach Cohnheim . . . . .	265
Darstellung nach Raubitschek . . . . .	265
Trennung von Trypsin und Erepsin nach Waldschmidt-Leitz . . . . .	266
Bestimmung nach Cohnheim . . . . .	267

	Seite
Bestimmung nach Waldschmidt-Leitz . . . . .	267
Bestimmung nach Abderhalden . . . . .	268
Gewebsproteasen (Autolyse). . . . .	269
Nachweis nach Salkowski . . . . .	269
Nachweis nach Rona und Mislowitzer . . . . .	270
Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl . . . . .	271
Mikroverfahren nach Bang . . . . .	271
Verfahren nach Folin . . . . .	273
Enteiweißungsmethoden . . . . .	274
Mit Sublimat nach Schenck . . . . .	274
Mit Trichloressigsäure . . . . .	274
Mit Natriumwolframat nach Folin und Wu . . . . .	274
Mit kolloidalem Eisenhydroxyd nach Rona und Michaelis . . . . .	275
Mit Kaolin nach Michaelis und Rona . . . . .	276
Bestimmung des Aminosäurenstickstoffs nach Folin . . . . .	276
Abwehrfermente von E. Abderhalden . . . . .	280
Nachweis nach E. Abderhalden . . . . .	280
Nachweis nach Pregl und de Crinis (refraktometrisch). . . . .	281
Nachweis nach P. Hirsch (interferometrisch) . . . . .	282
Proteolytische Pflanzenfermente . . . . .	282
Papain . . . . .	283
Darstellung nach Willstätter, Graßmann und Waldschmidt-Leitz . . . . .	283
Bestimmung nach Willstätter, Graßmann und Waldschmidt-Leitz . . . . .	284
Amidasen . . . . .	286
Urease . . . . .	286
Darstellung nach Jacoby und Sugga . . . . .	286
Bestimmung nach Lövgren . . . . .	286
Histozym . . . . .	287
Darstellung und Bestimmung von Smorodinzew . . . . .	288
Arginase . . . . .	288
Darstellung von Edlbacher . . . . .	289
Bestimmung von Edlbacher, Edlbacher und Bonen . . . . .	291
Nucleasen. . . . .	292
Nachweis nach Sachs, Tschernoruzki, Pighini . . . . .	293
Darstellung von Nucleosidase nach Levene . . . . .	294
Darstellung von Nucleosidase nach Tannhauser und Ottenstein . . . . .	295
Darstellung von Adenase und Guanase nach Schittenhelm . . . . .	297
Nachweis von Harnsäure in Gewebsauszügen nach Steudel und Suzuki . . . . .	297
Bestimmung der Harnsäure in Organen nach His und Hagen . . . . .	298
Darstellung von urikolytischen Fermentlösungen nach Schittenhelm . . . . .	298
Nach Battelli und Stern . . . . .	299
Darstellung des Alantoins nach Wiechowski . . . . .	299
Katalase . . . . .	300
Darstellung von Blutkatalase nach Tsuchihashi . . . . .	300

	Seite
Darstellung von Leberkatalase nach Battelli und Stern und Hennichs . . . . .	300
Bestimmung der Katalase nach Hennichs. . . . .	301
Bestimmung der Katalase nach Tsuchihashi . . . . .	301
Bestimmung der Katalase nach Morgulis . . . . .	301
Tyrosinase . . . . .	303
Bestimmung nach Bach . . . . .	304
Bestimmung nach Raper und Wormall . . . . .	304
Lakkase. . . . .	305
Salicylase . . . . .	305
Peroxydase aus Meerrettich . . . . .	306
Darstellung nach Willstätter und Stoll . . . . .	307
Bestimmung nach Willstätter und Stoll . . . . .	308
Fermente der Blutgerinnung . . . . .	309
Gewinnung des Nativplasmas . . . . .	309
Gewinnung von Fibrinogenlösungen nach Hammarsten . . . . .	309
Bestimmung des Fibrinogens nach Starlinger . . . . .	310
Gewinnung des Thrombins . . . . .	311
Nach Schmidt . . . . .	311
Nach Howell . . . . .	312
Nach Bleibtreu-Atzler und Tsunoo . . . . .	312
Gewinnung von Thrombokinase nach Morawitz . . . . .	313
Bestimmung des Thrombins nach Wohlgemuth . . . . .	313
Bestimmung der Gerinnungszeit . . . . .	314
Nach Fuld . . . . .	314
Nach Heubner und Rona . . . . .	315
Nach Frisch und Starlinger . . . . .	317
Nach Wöhlisch . . . . .	317
Nach Wöhlisch und Pieritz . . . . .	319
Sachverzeichnis . . . . .	321

## Allgemeiner Teil.

### Allgemeines über Darstellung der Fermente.

Bei der Darstellung von Fermenten handelt es sich darum, Lösungen oder feste Präparate zu gewinnen, die die dem Ferment eigentümlichen Wirkungen in stärkerer Weise als das Ausgangsmaterial zeigen und dabei von Begleitstoffen (Kohlehydraten, Eiweißkörpern, Kolloiden, Salzen) möglichst frei sind.

Zur Gewinnung von fermenthaltigem Material sind prinzipiell zwei Methoden möglich:

1. Die Gewinnung von fermenthaltigem Sekret, z. B. Speichel, Magensaft, Verdauungssäften unter Anwendung der Methodik der Fistelanlegung von Pawlow und seiner Schule<sup>1)</sup>.

2. Die Gewinnung von fermenthaltigem Substrat aus den fermentführenden Organen oder Zellen durch Extraktion. Diese Art der Gewinnung der fermenthaltigen Säfte (bzw. Preßsäfte) aus den Organen ist die am häufigsten angewandte.

Die Organe der größeren Haustiere werden sofort nach dem Schlachten möglichst sauber entnommen. Zum Transport werden sie mit einem geeigneten Antisepticum versetzt (siehe unter Konservierung) und auf einer niederen Temperatur gehalten. Die Organe kleinerer Tiere werden, wenn möglich, nach den Regeln der Asepsis entnommen. Zur Entfernung von Blut werden die Organe vorher mit Ringerlösung, physiologischer Kochsalzlösung oder mit einer anderen geeigneten Spülflüssigkeit durch die Gefäße durchgespült.

Zur Zerkleinerung werden die Organe mit der Schere grob zerschnitten, von den bindegewebigen Anteilen möglichst befreit und mit Quarzsand in der Reibschale zerquetscht. Auch die verschiedenen Formen von Fleischzerkleinerungsmaschinen können in Anwendung kommen. Eine Form, die sich speziell für die vorliegenden Aufgaben eignet, ist von Latapie angegeben worden.

Eine sehr gründliche Zerkleinerung gelingt in gefrorenem Zustande. Vorteilhaft wird man dazu Kältemischungen anwenden.

---

<sup>1)</sup>Siehe z. B. London: Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth. Bd. 3, S. 74. 1910.

Kossel hat eine Methode und Apparatur beschrieben, bei der die Organe mittels flüssiger Kohlensäure gefroren und dann durch sehr rasch rotierende Messer sehr fein zerschnitten werden<sup>1)</sup>. Gut gelingt die Zerkleinerung speziell von Muskulatur nach G. Lyding<sup>2)</sup>. Die Muskeln kommen sofort nach der Entnahme in ein Dewarsches Standgefäß mit flüssiger Luft. Dann werden die Muskeln in eine einfache Schicht guter Verbandgaze eingeschlagen und in einer mit flüssiger Luft gekühlten Porzellan-schale und mit ebenso behandeltem Pistill zermahlen. Gleichzeitig erreicht man bei der tiefen Temperatur ein sofortiges Sistieren aller fermentativen Prozesse (siehe auch Muskelglykolyse, S. 195).

Der mit Quarzsand zu einer kompakten Masse zerriebene Brei kann dann in einer Presse weiter ausgepreßt werden (vgl. Spez. Teil, S. 178, bei der Gewinnung des Hefepreßsaftes). Oder man gewinnt die schwer von der Zelle trennbaren Fermente („Endoenzyme“), indem man die Zelle der Autolyse, dem spontanen Zerfall der Zellstruktur nach dem Tode, überläßt (vgl. S. 180).

Der Extraktion von fermentführendem Material geht meistens eine Trocknung voraus. Eine solche erreicht man mittels verschiedener Methoden. Man kann das zermahlene Material mit Alkoholäther behandeln (wegen dessen nicht indifferenten Natur nicht immer durchführbar). In anderen Fällen wird der fein zermahlene Organbrei mit etwas Toluol versetzt, auf Glasplatten gestrichen und mittels eines warmen Luftstromes (Ventilator oder Föhnapparat) schnell getrocknet. Danach wird das Material in einer Farbmühle fein zermahlen [Wiechowski<sup>3)</sup>]. Um temperaturempfindliche, fermenthaltige Flüssigkeiten schnell einzudampfen und zu trocknen, bedient man sich zweckmäßig eines Ventilator-trockenschrankes. Die Luft wird vorgewärmt und mittels eines Ventilators über die in flachen Schalen befindlichen Flüssigkeiten getrieben. Auf demselben Prinzip beruht auch der Faust-Heimsche Trockenapparat. Die gut getrockneten Präparate sind meist lange in voller Aktivität haltbar und stellen die übliche Handelsform von Fermenten dar.

Bei den Darstellungsmethoden im spez. Teil ist bei jedem Ferment das geeignete Extraktionsmittel des Fermentes aus dem Organbrei oder dem getrockneten Material angegeben. Als solche

1) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 33, S. 5. 1901.

2) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 113, S. 226. 1921.

3) Hofmeisters Beitr. Bd. 9, S. 233. 1907 und Abderhaldens Arbeitsmethoden Bd. 3, S. 282. 1910.

kommen in Betracht Wasser, physiologische Kochsalzlösung oder eine wässrige Lösung von einer bestimmten Acidität, ferner Glycerin. Zur ausgiebigen Durchmischung von Organbrei und Flüssigkeit wird eine Zeitlang im Schüttelapparat geschüttelt. Manche Fermente (wie z. B. Lab) werden jedoch durch andauerndes Schütteln geschädigt. Die Wahl des Extraktionsmittels richtet sich nach der Löslichkeit des Ferments im Extraktionsmittel bei möglichst geringer gleichzeitiger Extraktion von Begleitstoffen. Auch darf natürlich das Ferment durch das Extraktionsmittel nicht geschädigt werden.

Die meisten Fermente sind in Glycerin löslich. Die Glycerinextrakte haben den Vorzug, nur wenig Eiweißstoffe zu enthalten und der Ansiedlung von Bakterien sehr hinderlich zu sein; außerdem sind die Fermente in Glycerin meist sehr stabil (siehe Lipase, Trypsin, Amylase)<sup>1)</sup>.

Die wässrigen oder glycerinhaltigen Fermentextrakte werden von dem Organbrei durch Filtrieren, Kolieren oder durch Zentrifugieren getrennt und können in manchen Fällen gleich zum Versuch benutzt werden. Meist ist aber eine weitere Reinigung der Fermente (bzw. Fermentgemische) nötig, wie sie im speziellen Teil für jedes Ferment beschrieben ist.

### Auswählende Adsorption und Elution.

Die von Willstätter eingeführten Methoden der auswählenden Adsorption und Elution beruhen darauf, daß die einzelnen Fermente gegen verschiedene Adsorbentien sich verschieden verhalten, indem ein Ferment von diesem, ein anderes von einem anderen Adsorbens adsorbiert wird. Das ermöglicht die Isolierung einheitlicher Fermente aus Fermentgemischen. Da die Begleitstoffe vom geeigneten Adsorbens unter Umständen nicht aufgenommen werden, so gelingt auf diese Weise auch eine mehr oder weniger weitgehende Reinigung der Fermente. Ebenso „auswählend“ kann die Loslösung (Elution) der Fermente vom Adsorbens bei zweckmäßiger Auswahl der Elutionsmittel gestaltet werden. „Es gibt nur eine einzige allgemeine Methode für die Isolierung der Enzyme, die Anwendung der auf kleinen Affinitätsbeträgen, auf Affinitätsresten beruhenden Adsorptionsvorgänge“ (Willstätter). Maßgebend für die Adsorption sind eine Reihe von Faktoren: Die Natur des Adsorbens, seine Darstellungsweise, seine elektrische Ladung, der Reinheitsgrad der fermenthaltigen Lösung, das Reaktionsvolumen, die Natur des Lösungsmittels (Wasser,

<sup>1)</sup> Vgl. Oppenheimer-Kuhn: Die Fermente. 5. Aufl., S. 47. 1926.

Alkohol, Glycerin), die Anwesenheit von Elektrolyten, die Wasserstoffionenkonzentration usw.

Als Maß für die Adsorption dient nach R. Willstätter der Adsorptionswert (A. W.). Der Adsorptionswert gibt die Anzahl Enzymeinheiten (siehe diese) an, die unter bestimmten Bedingungen von 1 g des Adsorptionsmittels (z. B.  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) aufgenommen werden. Die Feststellung des A. W. dient dazu, bei der präparativen Reinigung von Fermenten dasjenige Adsorbens auszuwählen, das in möglichst kleiner Menge ein Maximum an Adsorbendum aufnimmt.

Als Adsorbentien dienen meistens Kaolin und Tonerde, gelegentlich kommen noch andere Stoffe in Frage, z. B. Tannin, Cholesterin. Wenn im spez. Teil bei der Reinigung der Fermente Einzelvorschriften gegeben werden, so sollen diese nur ein Schema der Arbeitsmethodik bedeuten. Dem Untersucher fällt jedoch jeweils die Aufgabe zu, nach den skizzierten Angaben im gegebenen Fall seine optimalwirkenden Adsorbentien und deren optimale Bedingungen selbst auszuprobieren.

Für die Befreiung der Fermente aus ihrer Bindung, die Elution, gilt in theoretischer und praktischer Hinsicht prinzipiell das gleiche wie für die Adsorption. Die Zerlegung der Adsorbate, die im Gegensatz zur Adsorption eine meßbare Zeit erfordert, wird gewöhnlich durch eine Änderung des Reaktionsmilieus ermöglicht. Als Eluentia eignen sich sekundäre Alkaliphosphate oder verdünntes Ammoniak gut.

Beispiele für die auswählende Adsorption und Elution findet man im spez. Teil für Lipasen (S. 90), Carbohydrasen (S. 126, 136, 142), Proteasen (S. 235, 263, 266).

### Dialyse und Filtration.

Reinigung durch Dialyse. Ein weiteres Hilfsmittel zur Reinigung von Fermenten bietet die Dialyse, bei der die Fermente selbst nur spärlich durch die Membranporen gehen, während die Elektrolyte ungehindert hindurchtreten. Doch ist hierbei zu beachten, daß eine völlige Entfernung der Elektrolyte in manchen Fällen eine irreversible Zerstörung von Ferment zur Folge hat. Die Anordnung bei dem Dialysieren ist aus den Abbildungen 1—3 ersichtlich.

Dialysiermembranen: Man benutzt entweder käufliche Diffusionshülsen (z. B. Schleicher & Schüll, Rhld., oder Pergament, dann sog. „Fischblasen“), oder stellt sich selbst aus Kolloidium solche wie folgt her.

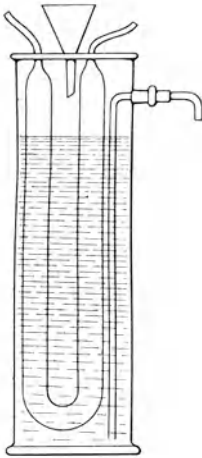


Abb. 1.

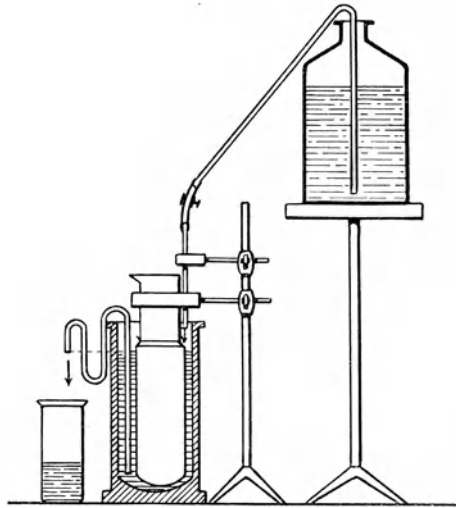


Abb. 2. (Aus Wiechowski, Hofmeisters Beitr. 9, S. 243, 1907.)

Aus Filtrierpapier hergestellte Extraktionshülsen von Schleicher & Schüll werden durch Ausgießen mit warmem destilliertem Wasser angefeuchtet, das überschüssige Wasser wird entfernt. Ehe die Hülsen erkaltet sind, werden sie mit Kollodium (z. B. D. A. B. 4%) gefüllt, sofort wieder entleert und auf diese Weise eine möglichst dünne erste Kollodiumhaut erzeugt. Man gießt das übrige Kollodium wieder heraus und achtet sorgfältig darauf, daß nicht etwa ein Kollodiumtropfen am Boden der Hülse zurückbleibt. Nach 5 Min. Trocknen gießt man in derselben Weise eine zweite, ebenfalls dünne Schicht und läßt das überschüssige Kollodium gleichfalls sorgfältig herauslaufen. Nach wiederum 5—10 Min. Trocknen taucht man die ganze Hülse in kaltes Wasser. Nach 20 bis 30 Min. Wässern ist der Dialysator gebrauchsfertig. Verwendet man verdünntere, z. B. nur 2 proz. Kollodiumlösung (hergestellt durch Verdünnen der käuflichen Lösung mit dem gleichen Volumen einer Mischung von 7 Teilen

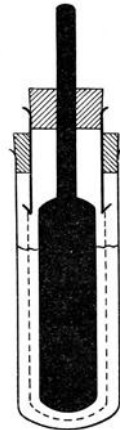


Abb. 3. Ein geschlossenes Glasgefäß oder eine Glasstange steckt im Innern der Kollodiumhülse. Dadurch wird die relative Oberfläche der dialysierenden Flüssigkeit vergrößert; ferner kann ihr Niveau gut geregelt werden. (Anordnung von Dr. Iwasaki; vgl. auch Abb. 56, S. 184.)



Äther und 1 Teil absolutem Alkohol), so erhält man weniger dichte und daher schneller wirkende Dialysatoren. Man eicht die Dialysatoren z. B. mit 0,05 % Nachtblaulösung, die die Membran nicht passieren darf<sup>1)</sup>.

Herstellung eines Kollodiumdialysierschlauchs nach L. Michaelis<sup>2)</sup>. Man gieße einen kleinen Glaszylinder (z. B. von 25 cm<sup>3</sup> Inhalt) voll Kollodium, gieße das Kollodium zum größten Teil wieder aus und lasse das zurückbleibende Kollodium trocknen, indem man den Zylinder in horizontaler Lage ständig rollt. Dann gieße man noch eine Schicht Kollodium hinein und lasse in gleicher Weise nochmals trocknen. Nach einiger Zeit kann man den gebildeten Kollodiumschlauch von der Glaswand vorsichtig ablösen und aus dem Glaszylinder herausziehen. Es ist jedoch vorteilhaft, nach dem Entweichen des Äthers den Schlauch mit destilliertem Wasser zu füllen und 10—15 Min. mit dem Wasser stehen zu lassen. Man kann die Ablösung des Schlauches von der Glaswand dadurch erleichtern, daß man zwischen den Schlauch und das Glas etwas destilliertes Wasser gießt. Danach kommt der Schlauch in destilliertes Wasser. Zum Gebrauch wird er zur Hälfte mit destilliertem Wasser gefüllt. Dann wird er oben vorsichtig und gut abgetrocknet und ein Gummistopfen durch Eintauchen in Kollodium und Überpinseln gut mit dem Kollodiumschlauch verklebt<sup>3)</sup>.

Herstellung eines Kollodiumdialysierschlauches nach Angaben von Trendelenburg. Die Durchgängigkeit einer Kollodiumhülse ist bestimmt durch ihren Gehalt an Äther und Alkohol in dem Augenblick, in dem sie nach ihrer Herstellung mit Wasser in Berührung kommt. Damit also eine solche Hülse gleichmäßig durchgängig ist, muß sie zu diesem Zeitpunkt in allen ihren Teilen den gleichen Gehalt an Äther und Alkohol haben. Dies ist schwer zu erreichen, wenn man die Kollodiumhülse durch Ausgießen eines Gefäßes (Zentrifugenglas oder dergl.) herstellt, da der Äther am Boden des Gefäßes langsamer verdunstet als an seinem Rand. Es ist deshalb zweckmäßiger, die Hülsen auf der Außenwand eines Glasgefäßes anzufertigen, da hier die ganze Kollodiumschicht gleichmäßig der Luft ausgesetzt wird. Die bei letzterem Verfahren auftretenden Schwierigkeiten

<sup>1)</sup> Dies nach Ostwald, W.: Kleines Praktikum der Kolloidchemie. 4. Aufl., S. 24. 1922.

<sup>2)</sup> Michaelis: Praktikum. 2. Aufl., S. 92. Ein gutes Kollodium liefert die Chem. Fabrik auf Aktien (vorm. E. Schering) Berlin N.

<sup>3)</sup> Über Darstellung von Kollodiummembranen vgl. auch Asheshov: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 92, S. 362.

bei der Ablösung der Hülsen von der Unterlage sind durch den Kunstgriff der Gelatinierung des Glases nach Gates<sup>1)</sup> überwunden.

Man schmilzt Glasröhren an ihrem unteren Ende so weit zu, daß nur noch eine Öffnung von 1—2 mm Durchmesser offen bleibt. Dann taucht man diese gereinigten aber nicht besonders entfetteten Röhren in eine warme 10 proz. Lösung gewöhnlicher käuflicher Gelatine 1—2 mal etwas weiter ein, als nachher die Kollodiumhülle reichen soll. Hierdurch wird das enge Loch am unteren Ende der Röhre mit Gelatine verschlossen, ebenso überzieht sich derganze eingetauchte Teil des Glasrohres mit einer Gelatinehaut. Dann hängt man die Glasröhren an ihrem nicht benutzten Teil mindestens 6 Std. zum Trocknen auf. Es ist darauf zu achten, daß bei der Trocknung der Gelatineverschluß am unteren Ende des Rohres nicht durch Schrumpfung reißt, da sonst Kollodium dort in das Glasrohr eindringt und die Ablösung der fertigen Hülle zum mindesten erschwert. Die Röhren mit der angetrockneten Gelatine werden dann mehrmals in die Kollodiumlösung eingetaucht. Nach jedem Eintauchen läßt man die Kollodiumlösung kurz abtropfen, dann wird das Glasrohr in horizontaler Haltung so lange um seine Achse gedreht, bis das Kollodium so weit erstarrt ist, daß es nicht mehr an den abhängigen Teilen des Rohres zu einer dickeren Schicht oder zu Tropfen zusammenfließt. Auf diese Weise wird die Schichtdicke des Kollodiums auf dem ganzen eingetauchten Teil des Glasrohres fast gleichmäßig. Dann trocknet man weiter, bis die Kollodiumschicht nicht mehr deutlich nach Äther, wohl aber noch kräftig nach Alkohol riecht. Hierauf taucht man von neuem in die Kollodiumlösung und wiederholt dies so oft, bis die Schicht auch bei dem oben angegebenen Trocknungsgrad deutlich (0,1 bis 0,2 mm) den Durchmesser des Glasrohres vergrößert. Dies ist durch Vergleich des in die Kollodiumlösung eingetauchten Teiles der Röhre mit dem nicht eingetauchten leicht festzustellen.

Man kann die käufliche 4 proz. Kollodiumlösung der Apotheken bei diesem Verfahren gut verwenden. Löst man selbst das Kollodium, so ist es zweckmäßig, neben Äther nicht absoluten Alkohol dazu zu verwenden, sondern 40 % von 90—95 proz. Alkohol. Man vermindert so die Gefahr, daß durch zu langes Trocknen, d. h. zu weit gehende Verdunstung von Äther und Alkohol die Hülsen vollkommen — auch für Wasser — impermeabel werden.

Ist die Hülle genügend dickwandig und bis zu dem oben angegebenen Grad getrocknet, so stellt man das Glasrohr in

<sup>1)</sup> Gates, Fr. L.: Journ. of exp. med. **35**, 635. 1922 nach Trendelenburg, P.: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 199, S. 237. 1923, und mündliche Mitteilung von Dr. Weber.

zimmerwarmes Wasser und füllt auch sein Lumen damit. Dann erwärmt man bis etwa  $40^{\circ}$ , wodurch sich nach kurzer Zeit der Gelatineüberzug des Rohres und seiner unteren Öffnung verflüssigt. Die Kollodiumhülse gleitet nun langsam von der Röhre herunter, wobei das Wasser aus dem Innern des Glasrohres durch das Loch an seinem unteren Ende den Hohlraum in der Hülse füllt, der durch ihr Abgleiten unter dem unteren Ende der Glasröhre entsteht. Die Hülse bleibt auf diese Weise faltenlos und glatt. Bisweilen ist die ganze Hülse auf dem Glase durch drehende Bewegungen verschieblich, also gelöst, hängt aber an ihrem oberen Rand fest. Es ist dann zweckmäßig, diesen Rand durch einen kreisförmigen Skalpellschnitt abzuschneiden, worauf die so etwas verkürzte Hülse abgleitet. Die Temperatur des Wasser soll die oben angegebene Temperatur nicht wesentlich überschreiten, da sich das Kollodium sonst um die Glasröhre zusammenzieht und die Hülse dann wesentlich schwerer abzuziehen ist.

Die fertige Hülse soll je nach ihrer Dicke fast klar durchsichtig bis eben ganz leicht opaleszent, jedenfalls nicht deutlich trübe sein und keine weiß opaken Stellen enthalten. Ihre Durchgängigkeit prüft man mit einer Alkalichloridlösung als Füllung,  $\text{AgNO}_3$  als Außenlösung. Nach einer Eintauchdauer von 10—20 Sek. muß sie von einem gleichmäßigen weißen Schleier von  $\text{AgCl}$  umgeben sein.

Da Kollodiumhülsen im Gebrauch durch normale wie anormale Osmose leicht überlaufen, ist es zweckmäßig, sie mit einem Steigrohr zu verschließen. Zu diesem Zweck schiebt man die fertige Hülse 1—2 cm auf eine Glasmanschette passender Weite — am besten auf ein einige Zentimeter langes Stück desselben Glasrohres, auf dem man die Hülse hergestellt hat. Dann fächelt man die Glasmanschette mit dem daraufgezogenen Rand der Hülse vorsichtig in der Flamme eines Glasbrenners, wobei der Hülsenrand abtrocknet und sich um die Manschette fest zusammenzieht. Es ist hierbei darauf zu achten, daß nur das dem Glas aufliegende Kollodium mit der Flamme in Berührung kommt, nicht aber die eigentliche Hülse, da in diese sofort Löcher einbrennen! Den Rand der Hülse befestigt man dann vollkommen dicht auf der Manschette, indem man ihn durch herumgegossene Kollodiumlösung möglichst rasch festklebt. Während nämlich diese Kollodiumlösung antrocknet, darf der eigentliche Hüsenkörper unter dem unteren Rand der Manschette nicht austrocknen, da er sonst völlig impermeabel wird. Der Kollodiumring wird bei Zimmertemperatur völlig getrocknet, bis zur Verdunstung des gesamten Alkohols, indem man die Hülse senkrecht

aufstellt und bis zum unteren Rand der Glasmanschette mit Wasser füllt. Hierdurch ist einer Austrocknung des eigentlichen Hülsekörpers genügend vorgebeugt. In solche mit einer Glasmanschette endigenden Dialysierhülsen kann man leicht und oft einen Gummistopfen mit Steigrohr einsetzen, was bei Hülsen mit ungeschütztem Rand meist bald zum Einreißen der Hülse führt [H. Weber<sup>1</sup>].

Während die Trennung des wässerigen bzw. glycerinhaltigen Organauszuges von beigemengten Organteilchen durch gewöhnliche Filtration oder durch Zentrifugieren erfolgt, ist es bei der Reinigung der Fermente oft erwünscht, die Lösung möglichst, und zwar möglichst schnell von Elektrolyten zu befreien. Dazu dient hauptsächlich die Elektrodialyse. In diesem Zusammenhange sei auch die Ultrafiltration erwähnt, wenn auch diese hauptsächlich bei der Verarbeitung des der Fermentwirkung unterworfenen Materials in Betracht kommt.

Ultrafilter. Darstellung nach W. Ostwald. Ein gewöhnliches glattes Filter wird in einem sauberen Trichter dicht angelegt, mit heißem Wasser ausgiebig angefeuchtet, das tropfbar vorhandene Wasser durch Ausschwenken gründlich entfernt. Von einer 4 proz. Kollodiumlösung, die ebenfalls vorsichtig erwärmt wird, werden 20—30 cm<sup>3</sup> in das nasse Filter gegossen. Durch möglichst schnelles Drehen des Trichters wird eine erste Kollodiumschicht auf dem Papier hergestellt. Man achte darauf, daß das Kollodium nur einmal über die Filterfläche läuft, da sonst zu dicke und zu langsam filtrierende Schichten entstehen. Das überflüssige Kollodium wird sorgfältig ausgegossen, so daß in der Spitze des Filters kein Tropfen zurückbleibt. Man läßt 5—10 Min. an der Luft trocknen, wobei man das steif gewordene Filter vorübergehend aus dem Trichter herausnimmt. Mit der gleichen angewärmten Kollodiumlösung wird sodann das Filter ein zweites Mal ausgegossen und ebenso behandelt. Nach 5—10 Min. Trocknen an der Luft wird das Filter in destilliertes Wasser getaucht; nach 20—30 Min. ist es gebrauchsfertig. Vor dem Gebrauch wird das Filter einmal mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Man eicht die Filter mit Nachtblaulösung oder Mastixhydrosol. Zur Filtration wird vorteilhaft der Trichter mit einem Filterhütchen mittels eines durchbohrten Gummistopfens an eine Saugflasche angeschlossen. Der Saugdruck soll dabei nicht zu stark werden.

Beim Verdünnen der 4 proz. Kollodiumlösung mit Ätheralkohol (7 Teile Äther und 1 Teil Alkohol) in gleicher Arbeitsweise erhält

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 158, S. 463. 1925.

man Filter mit größerer Filtrationsgeschwindigkeit, aber entsprechend geringerer Dichtigkeit. Für viele Zwecke empfiehlt sich z. B. eine 2—3 proz. Lösung, die schneller durchlassende, aber ebenfalls noch nachtblaudichte Filter gibt<sup>1)</sup>.

Eine praktische Modifikation der Ultrafilterdarstellung ist von Wha angegeben. Filter (5—6 cm Durchmesser) werden in der in der Abbildung angegebenen Weise durchgeschnitten, wobei der mittlere Teil, dessen Größe einer Siebplatte (von etwa 2 cm Durchmesser) entspricht, frei bleibt. Das Filter *a* wird nun fest an den Trichter (von etwa 5,5 cm Durchmesser) und an die in den Trichter gelegte Siebplatte angelegt, indem man in der in Abb. 4 angedeuteten Weise faltet.

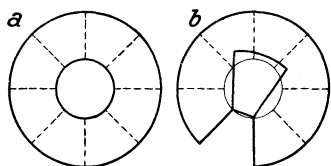


Abb. 4.

Man befeuchtet dann das Filter mit destilliertem Wasser und saugt an der Wasserstrahlpumpe scharf ab, nachdem man das Filter an einer Saugflasche oder besser einem Saugreagensglas angebracht hat. Dann bedeckt man in ähnlicher Weise das Filter *a* mit dem Filter *b*, aber so, daß die Einschnitte in den Filtern nicht übereinander kommen, sondern gegeneinander verschoben sind, legt die den Trichterrand überragenden Teile des Filters nach außen um und schmiegt sie der Glaswand fest an (eventuell unter Zuhilfenahme eines Bindfadens). Auch dieses 2. Filter wird mit destilliertem Wasser befeuchtet, dann scharf abgesaugt, so daß die Filter nur spurweise feucht sind. Jetzt kann, wie oben beschrieben, an die Dichtung mit Kollodium geschritten werden. Die fertigen Trichter (bzw. Filter) müssen stets in mit Toluol versetztem Wasser liegen.

Eintauchfilter nach Giemsa<sup>2)</sup>. Die Apparatur (Abb. 5, 6) besteht im wesentlichen aus einem reagensglasförmigen Porzellan- zylinder, einer dazu passenden Hülse aus Filtrierpapier (die man auch selbst herstellen kann) und der eigentlichen Filtrier- membran.

Der Zylinder ist außen und innen glasiert und in seinem unteren, geschlossenen Teil siebartig durchbohrt. Die Filtrierhülse dient als Unterlage für die Kollodiumschicht. Zur Darstellung der Membran stülpt man zunächst die Hülse so weit über den perforierten Teil des Zylinders, bis sie überall prall anliegt. Der obere Rand der Hülse ragt etwa 1 cm über den durchlocherten Teil des Zylin-

<sup>1)</sup> Aus Ostwald, W.: Praktikum. 4. Aufl., S. 27.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 132, S. 488. 1922.

ders hinaus. Sodann wird die Hülse gut mit Wasser angefeuchtet, und das überschüssige Wasser durch Rollen der Hülse auf Filtrierpapier entfernt. Man wischt den unbedeckten Teil des Zylinders völlig trocken ab, taucht bis etwa 1 cm über den oberen Rand in Kollodium hinein, zieht heraus und sorgt durch Drehen des Zylinders für eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Kollodiums. Nach Trocknen des Kollodiums wiederholt man die Prozedur noch ein- oder zweimal. Dann fügt man das Absaugerohr in den Apparat und hängt diesen so tief ins Wasser, daß die ganze Membran hiermit bedeckt ist. Nach  $\frac{1}{4}$ stündiger Wässerung entfernt man die letzten Reste des Kollodiumlösungsmittels dadurch, daß man den Zylinder in frisches Wasser taucht und unter

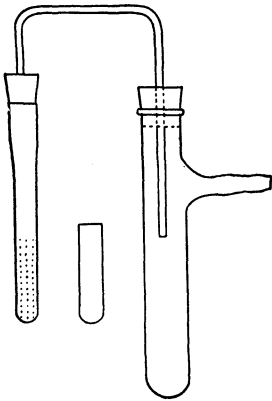


Abb. 5. Apparat nach Giemsa mit Filterzylinder  $8 \times 0,9$  cm, in der Mitte Hülse aus Filtrierpapier.

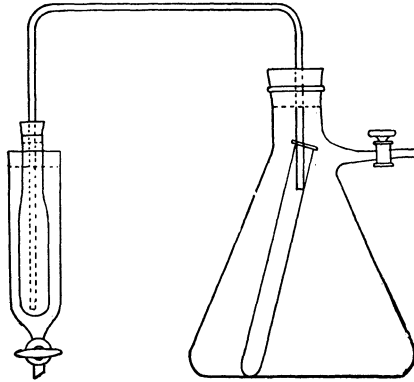


Abb. 6. Apparat nach Giemsa mit fertig montiertem Filterzylinder  $16 \times 1,8$  cm.

Anstellen der Luftpumpe eine Zeitlang hindurchfiltriert. Nunmehr ist der Apparat verwendungsbereit.

Eiweißhaltige Sole filtriert man am besten aus einem verjüngten und in einen Hahn auslaufenden graduierten Glaszylinder (vgl. Abb. 6). Die ersten Anteile des Filtrates gießt man fort. Man achte darauf, daß die ganze Membran dauernd von Flüssigkeit umspült ist, da sie sonst eintrocknet und rissig wird. Das Absaugerohr läßt man zweckmäßig münden und setzt, um diesen nicht zu beschädigen, einen unten mit zahnförmigen Ausschnitten versehenen Gummischlauch auf sein Ende.

Über eine ähnliche Apparatur, die zu gleicher Zeit entstand,

s. Wha<sup>1)</sup>. Empfehlenswerte Filtervorrichtungen sind die von Bechhold und König angegebenen (Staatl. Porzellan-Manufaktur Berlin) und die Glas-Filtergeräte der Firma Schott in Jena.

### Elektrodialyse.

Unter Elektrodialyse versteht man den elektrischen Transport von membrandurchgängigen Ionen durch kolloidundurchlässige Membranen. Hier seien zwei Apparaturen angegeben, eine nach W. Pauli und eine nach Freundlich und L. F. Loeb.

1. Nach Pauli<sup>2)</sup>. Es wird in der Regel durch gewöhnliche Dialyse vorgereinigtes Material benutzt. Der angelegte Strom überschreitet meist nicht eine Dichte von 0,8—0,3 M. A. pro cm<sup>2</sup> Membranfläche. Bei dieser Anordnung ist es ohne weiteres möglich, zwei Pergamentpapier- oder Kollodiummembranen zur Abgrenzung des Kolloids zu gebrauchen. Die Elektrodialyse führt auf diesem Wege meist in 48 Stunden zum Ziel und kann bei 440 Volt direkter Spannung ausgeführt werden. Bedingung ist, daß keine Reaktionsänderungen in der Mittelzelle auftreten.

Die Apparatur zeigt die Abbildung 7. Die Pergamentpapier- oder Kollodiummembran werden entsprechend geschnitten und am Rande gut mit Vaseline gefettet. Sie halten infolge des guten Schliffes vollständig dicht beim Zusammensetzen und Anziehen des Apparates. Die Montierung erfolgt in vertikaler Stellung, darauf wird der Apparat horizontal umgelegt. Die zwei Außenzellen sollen getrennt mit Wasser durchspült werden. Als Anoden werden Platindrahtnetz-elektroden, als Kathoden auch solche aus Silber- oder aus Kupferdraht verwendet. Die größeren Apparate, die nur zur

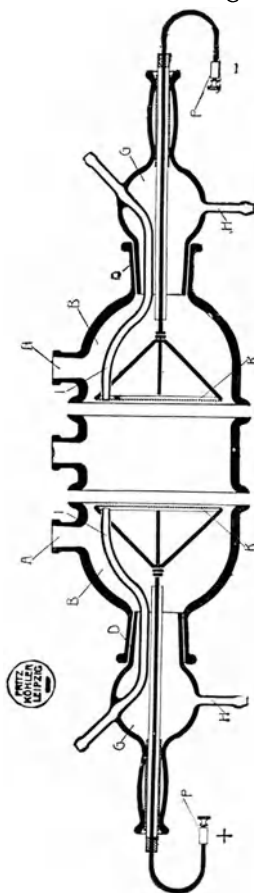


Abb. 7.

1) Biochem. Zeitschr. Bd. 144, S. 278. 1924.

2) Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 355. 1924.

Vorreinigung dienen, werden mit Graphitelektroden justiert. Bei einiger Erfahrung lernt man es bald, mittels einer eingeschalteten, sehr schwach glühenden Lampe und Widerständen die Stromstärke auch ohne Amperemeter abzustufen, bis man die volle Spannung anlegen kann.

2. Nach Freundlich und L. Farmer Loeb<sup>1)</sup>. Der benutzte Apparat hat die Form des Paulischen. Er besteht aus drei Teilen, die mit Schliften aufeinander passen. Die Membranen werden mit Cellonlack befestigt (man kann auch Gummiringe verwenden). Der Apparat wird durch Schellen zusammengehalten und kann durch einen Stiel an einem Stativ befestigt werden (siehe Abb. 8, 9). Die Mittelkammer faßt rund 60 cm<sup>5</sup> sie kann aber eine beliebige

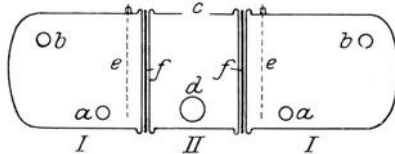


Abb. 8. I Außenkammer. II Mittelkammer, a Zufluß des Spülwassers, b Abfluß des Spülwassers, c Öffnung für den Rührer, d Abflußöffnung der Mittelkammer, e Elektroden, f Membranen.

Dimension haben; sie soll jedoch möglichst schmal sein (3—5 cm). Als Elektroden werden kreisförmige Netze aus dünnem Platindraht benutzt. Die Elektrode soll etwa 0,5 cm von der Membran entfernt sein. Die Spannung des angelegten Gleichstromes beträgt zwischen 12 und 120 Volt (meistens 120 Volt). An einem in den Stromkreis eingeschalteten Amperemeter kann gleichzeitig die Stärke abgelesen werden. Die Flüssigkeit der Mittelkammer wird durch einen schraubenförmig gewundenen Glasrührer gerührt. Als Membranmaterial dient Pergamentpapier (Schleicher & Schüll) und mit chromierter Gelatine imprägnierter Wollstoff. (10 g Gelatine, 3 g Ammoniumbichromat und 5 g Glycerin werden in 100 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst; der Wollstoff wird hiermit bestrichen und in der Sonne 1/2—1 Stunde, bei bedecktem Himmel einen Tag belichtet. Dies wird zwei- bis dreimal wiederholt.) Die Seitenkammern können mit destilliertem Wasser oder auch Leitungswasser durchspült werden. Der Zufluß ist vorteilhaft in der Nähe der Membran anzubringen. Die positive

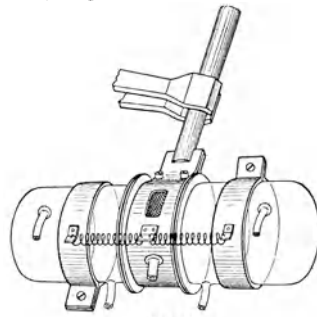


Abb. 9.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 150, S. 522. 1924.



Membran (chromierte Gelatine) befindet sich an der Anodenseite, die negative Membran (Pergamentpapier) an der Kathodenseite. Der  $p_h$  der Lösung der Mittelkammer muß kontrolliert werden; er darf sich nicht wesentlich ändern<sup>1)</sup>.

### Konservierung.

Fermente werden konserviert, indem man sie vor bakterieller und Selbstzersetzung schützt und in einen haltbaren Zustand überführt.

Das am häufigsten gebrauchte Desinfiziens ist Toluol, das die Fermente nur sehr wenig schädigt. Man nimmt zur Verhinderung der Infektion 1,0—2,0 cm<sup>3</sup> auf 100 cm<sup>3</sup> Lösung und schüttelt gut durch; Chloroform schädigt die Enzyme in stärkerem Maße; für Trypsin, Ereptasen, Invertase, Maltase und Zymase ist es u. U. brauchbar<sup>2)</sup>. Es wird in derselben Konzentration angewandt wie das Toluol. Thymol ist auch gut verwendbar (einige Krystalle auf 100 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit). Auf die Anwendung von Glycerin ist schon hingewiesen (vgl. S. 3).

Man wird beim Arbeiten mit Fermentlösungen immer gut daran tun, diese unter Eiskühlung aufzubewahren. Ein weiteres bequemes Hilfsmittel, Fermente vor Zerstörung zu schützen, ist die Überführung in den Trockenzustand, in dem sie unbegrenzt haltbar sind. (Vgl. spez. Teil.)

## Nachweis und Messung der Fermentwirkungen.

### Das Reihenprinzip.

Bei Reihenversuchen ist es nicht statthaft, arithmetische Reihen zu benutzen, da das Verhältnis der Glieder der Reihen zueinander dann ein ganz verschiedenes ist. Vielmehr dürfen nur geometrische Reihen benutzt werden<sup>3)</sup>. Im allgemeinen wird man zur orientierenden Untersuchung eine gröbere Reihe ansetzen und dann immer feinere Reihen benutzen, soweit es die vorliegende Aufgabe erfordert und die Möglichkeit der exakten Erkennung der zu untersuchenden Reaktion es gestattet. Zur Ansetzung solcher Reihen dient folgende Tabelle, die die ersten Glieder verschiedener geometrischer Reihen enthält. Jede Horizontalreihe in der Tabelle S. 15 ist eine solche geometrische Reihe, die die verschiedenen Potenzen der dazu gehörigen Zahl der linken Kolumne enthält<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Über „Elektro-Ultrafiltration“ vgl. H. Bechhold und A. Rosenberg, Biochem. Zeitschr. Bd. 157, S. 85. 1925.

<sup>2)</sup> Oppenheimer-Kuhn: Die Fermente. S. 74.

<sup>3)</sup> Vgl. hierzu Michaelis: Praktikum. 2. Aufl., S. 4.

<sup>4)</sup> Tabelle aus Michaelis: in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. 3, 1. Hälfte, S. 30.

Selbstverständlich kann man innerhalb jeder Reihe jedes Glied mit demselben beliebigen Faktor multiplizieren, ohne daß der geometrische Abstand der Glieder sich ändert.

Z. B. eine Reihe mit der Verdünnung nach Potenzen von  $1/2$  geordnet

$$1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 \dots$$

oder nach Potenzen von  $2/3$  geordnet

$$1; 0,67; 0,44; 0,30; 0,20 \dots$$

Die Volumina aller Fermentlösungen in der Reihe müssen dazu mit destilliertem Wasser auf das gleiche Volumen, z. B. 1 cm<sup>3</sup>, aufgefüllt werden.

Tabelle.

	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
	Potenz								
0,5	1,00	0,500	0,250	0,125	0,0625	0,0312	0,0156	0,00786	0,00393
0,6	1,00	0,600	0,360	0,216	0,130	0,0778	0,0467	0,0280	0,170
0,7	1,00	0,700	0,490	0,343	0,240	0,168	0,118	0,824	0,0570
0,8	1,00	0,800	0,640	0,512	0,410	0,328	0,262	0,210	0,168
0,9	1,00	0,900	0,810	0,729	0,656	0,590	0,531	0,478	0,430

Eine andere Anordnung von Reihen rührt von Fuld<sup>1)</sup> her. Dabei gelangt man in jeder Reihe von der Verdünnung 1 zu Verdünnung 10. Wenn man die Reihe in 10 Glieder teilen will, so benutzt man den Exponenten  $\sqrt[9]{10}$ . will man in 5 Glieder teilen, den Exponenten  $\sqrt[4]{10}$ .

Tabelle.

10	9	8	7	6	5	4	3	2
$\sqrt[9]{10} = 1,29$	$\sqrt[8]{10} = 1,33$	$\sqrt[7]{10} = 1,39$	$\sqrt[6]{10} = 1,47$	$\sqrt[5]{10} = 1,59$	$\sqrt[4]{10} = 1,78$	$\sqrt[3]{10} = 2,15$	$\sqrt{10} = 3,16$	
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1,3	1,3	1,4	1,5	1,6	1,8	2,1	3,2	10,0
1,7	1,8	1,9	2,1	2,5	3,2	4,6	10,0	
2,1	2,4	2,7	3,2	4,0	5,6	10,0		
2,8	3,2	3,7	4,6	6,3	10,0			
3,6	4,2	5,2	6,8	10,0				
4,6	5,6	7,2	10,0					
6,0	7,5	10,0						
7,7	10,0							
10,0								

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 54. 1907.

## Chemische Methoden.

Die bei der Untersuchung mit Fermenten anzuwendenden chemischen Methoden sind im speziellen Teil ausführlich geschildert. Im besonderen seien hier erwähnt: Enteiweißung (S. 274), maßanalytische Methoden (S. 101, 241, 254), mikro-gravimetrische Methoden (S. 116), Mikro-Kjeldahl-Bestimmung (S. 271), gasanalytische Methoden (S. 106, 198, 246), Mikro-Zuckerbestimmung (S. 144, 153, 155), Bestimmung der Aminosäuren (S. 276).

## Physikalische Methoden.

### Polarimetrie.

Für die Fermentmethodik kommt die Polarimetrie hauptsächlich in Betracht zur Bestimmung der kohlenhydratspaltenden Fermente, aber auch bei den polypeptidspaltenden Fermenten und bei den Nucleasen findet sie Anwendung.

### Apparatur.

Zur Untersuchung werden die Flüssigkeiten in Glasröhren von 2 oder 1 dm Länge eingefüllt. Die Auswahl der Röhren nach ihrer Länge hängt von der Färbung und Klarheit der Lösung ab. Bei gefüllter Röhre soll man beleuchtete Gegenstände beim Hindurchsehen scharf unterscheiden können. Zum Verschuß der Röhren dienen aufschraubbare Kappen aus Metall, die eine kleine Glas-

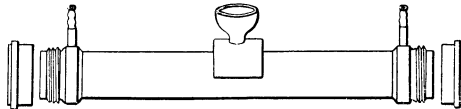


Abb. 10.

scheibe fest gegen einen Gummiring drücken. Sehr zweckmäßig sind die Röhren, die eine kleine Ausbuchtung tragen, die zur Aufnahme etwa eingeschlossener Luftblasen dient. Für Beobachtungen bei bestimmter Temperatur dienen Röhren mit Wassermantel (Abb. 10). Die beiden Aufsätze dienen zum Zu- und Abfluß des Wassers von bestimmter Temperatur. Der Tubus in der Mitte steht mit der inneren Röhre in Verbindung und dient zum Einbringen der Flüssigkeit und zur Aufnahme eines Thermometers.

**Lampen:** Als Lichtquelle dient Licht einer bestimmten Wellenlänge, in der Regel Natriumlicht. Gewöhnlich kommt Kochsalz oder

Natriumnitrit (Neuberg) in eine ringförmige Rinne aus Platin, die in die Gasflamme geschoben wird.

Billig und zweckmäßig ist die von Airila und Komppa angegebene Lampe (Abb. 11). Diese Lampen sind so aufzustellen, daß nur das Licht aus dem oberen Teil des Ausschnittes des Schutzschirmes zu dem Apparat gelangt.

Die optische Einrichtung eines der gebräuchlichsten Halbschatten-Polarisationsapparate ist in Abb. 12 dargestellt. Das Instrument ist mit einem zweiteiligen Polarisator nach F. Lippich versehen; dieser Polarisator besteht aus den Nicols  $N_1$  und  $N_2$ , sowie der Blende  $D$ . Der Apparat wird durch die Blende  $A^1$  und die Linse  $K$  hindurch von einer Lampe beleuchtet, welche in einer der Länge des Instrumentes entsprechenden Entfernung aufgestellt werden muß. Die Blende  $A$ , der Nicol  $N_3$ , sowie das kleine astronomische Fernrohr  $OR$  bilden die Analysator- oder Meßvorrichtung; letztere ist um die Längsachse des Apparates drehbar.

Die Beleuchtungslinse  $K$  entwirft von der Lampe ein Bild auf dem Fernrohrobjektiv  $O$ . Das Fernrohr  $OR$  ist scharf auf die Polarisatorblende  $D$ , die das Gesichtsfeld begrenzt, eingestellt. Durch die Nicols  $N_1$  und  $N_2$  wird das Gesichtsfeld in zwei Hälften, 1 und 2, die photometrischen Vergleichsfelder, geteilt, welche in den Abbildungen 13—15 gezeichnet sind.

Die Schwingungsrichtungen  $ol$  des Feldes 1 und  $or$  des Feldes 2 bilden einen kleinen Winkel  $\varepsilon$ , den sog. Halbschatten, miteinander. Bei der Einstellung wird der Ana-

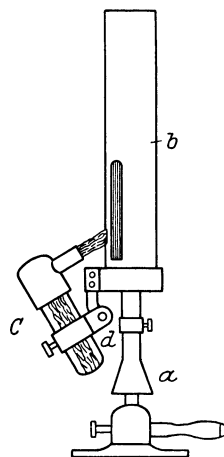


Abb. 11.  
Lampe nach Airila und Komppa.  $a$  Teclu-Brenner,  $b$  Metallzylinder mit seitlichem Einschnitt,  $c$  10 cm hohes Glasgefäß mit aufgesetzter Metallkappe, zu  $\frac{2}{3}$  mit 3 proz. NaCl-Lösung gefüllt, in der Asbestdocht steckt. Letzterer aus der Tülle heraustretend, ist im Winkel von  $45^\circ$  geschnitten. Vor jedesmaliger Benutzung muß die gebildete Salzkruke und das hart gewordene Dochtende abgeschnitten werden,  $d$  Scharnier zum Herausbewegen des Dochtes durch den Spalt an den Rand des Flammenkegels.

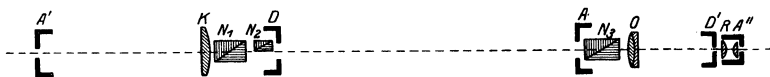


Abb. 12.

lysatornicol  $N_3$  mit dem Fernrohr zunächst so gedreht, daß ein Vergleichsfeld, z. B. das nur durch  $N_1$  hindurch beleuchtete

Feld 1, ganz dunkel erscheint, ausgelöscht ist (s. Abb. 13); dann ist die Schwingungsrichtung  $oa$  des von  $N_3$  hindurchgelassenen Lichtes senkrecht zu  $ol$ . Hierauf dreht man  $N_3$ , bis das andere

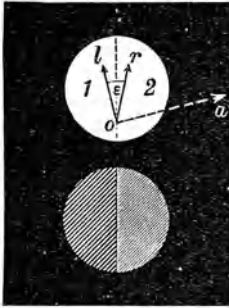


Abb. 13.

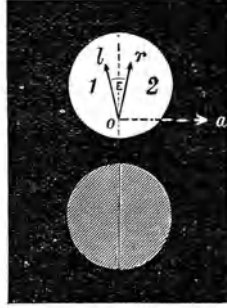


Abb. 14.

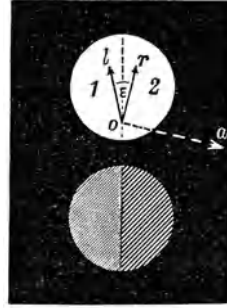


Abb. 15.

Feld vollkommen ausgelöscht ist, wie Abb. 15 zeigt. Dreht man nun  $N_3$  etwas zurück, so findet man eine Stellung, bei welcher beide Hälften des Gesichtsfeldes in geringer, gleicher Helligkeit erscheinen (s. Abb. 14). Auf diese gleich schwache Beleuchtung benachbarter Vergleichsfelder wird bei allen Halbschattenapparaten eingestellt.

**Polarisationsapparat:** Von den vielen Modellen soll hier nur ein Halbschattenpolarimeter mit Lippichs dreiteiligem Polarisator beschrieben werden.

Die optische Einrichtung des Apparates (Abb. 16) besteht aus einem Diaphragma  $S$ , einer Beleuchtungslinse (hier nicht gezeichnet), dann folgt der dreiteilige Lippichsche Polarisator bei  $P$ , bestehend aus einem um die Achse des Apparates drehbaren polarisierenden Nicolschen Prisma, welches das ganze Gesichtsfeld bedeckt, und zwei kleinen feststehenden Nicolschen Prismen (Halbprismen), die hinter dem großen in symmetrischer Stellung und so angeordnet sind, daß jedes ein äußeres Drittel des Gesichtsfeldes deckt. Hierdurch wird eine Dreiteilung des Gesichtsfeldes bewirkt. Ist nur ein feststehendes Halbprisma vorhanden, welches die eine Hälfte des Gesichtsfeldes deckt, so erhält man ein zweiteiliges Gesichtsfeld. Der dreiteilige Polarisator leistet das Doppelte an Genauigkeit, ist deswegen dem zweiteiligen bei weitem vorzuziehen. Das drehbare Prisma läßt sich behufs Änderung des Winkels zwischen den beiden Polarisationsebenen durch den fest-schraubbaren Zeiger bei  $h$  verstellen und die Größe des Winkels

(Halbschatten) an der Skala bei  $h$  ablesen. Der Winkel beträgt im allgemeinen  $7,5^\circ$ . Durch Verschiebung des Zeigers  $h$  an seiner Skala und hierdurch bewirkter Drehung des das ganze Gesichtsfeld deckenden Nicolschen Prismas, kann man auf maximale Schärfe bei der herrschenden Belichtung einstellen. Eine Halbröhre (nicht gezeichnet) zwischen  $P$  und  $R$  dient zur Aufnahme der Polarisationsröhren, oder es werden Glaströge auf einer Scheibe, die auf  $CC$  ruht, eingeschaltet. Im Zentrum von  $R$  ist das analysierende Nicolsche Prisma fest in die drehbare

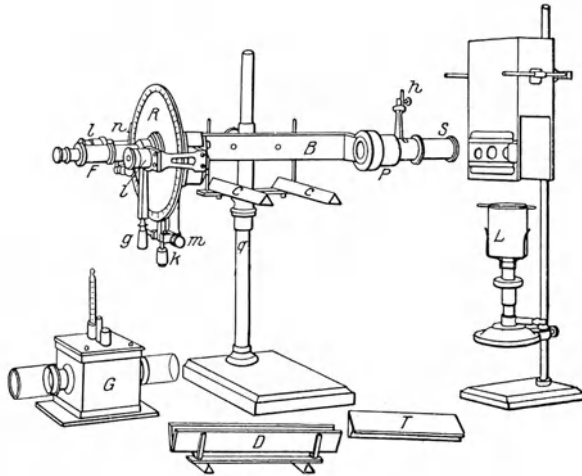


Abb. 16.

Scheibe eingefügt. Der Rand dieser Scheibe ist in Viertelgrade eingeteilt und durch Nonius in Hundertstel Grade ablesbar eingerichtet. Die Drehung erfolgt durch den Hebel  $g$  und weiterhin zum Zweck der feinen Einstellung nach Anziehen der Klemme  $k$  mittels der Mikrometerschraube  $m$ , und wird gemessen mit Hilfe der beiden feststehenden Nonien  $n$ , welche mit den Lupen  $l$  abgelesen werden.  $F$  stellt ein Fernrohr dar, mit dem man die Grenzlinien des dreiteiligen Gesichtsfeldes scharf einstellt.

Die Lichtquelle soll so stehen, daß durch die Beleuchtungslinse ein Bild von ihr auf dem Analysatordiaphragma entworfen wird. Zu dem Zweck hält man an das Analysatordiaphragma ein Blättchen weißes Papier und dicht vor die Lichtquelle einen zugespitzten Draht, alsdann gibt man der Lichtquelle mit dem Draht eine solche Lage, daß ein scharfes Bild der Drahtspitze auf dem

weißen Papier erzeugt wird. Die gewöhnliche Entfernung der Lichtquelle vom Apparateende beträgt 22 cm.

**Ausführung von Bestimmungen:** Man mißt im Dunkelmzimmer. Nach richtiger Aufstellung der Lampe stellt man das Fernrohr scharf auf die Trennungslinie der Vergleichsfelder ein. Dann wird die Klemme *K* gelöst und nun durch Bewegung des Hebels *g* dem Analysator eine Stellung gegeben, bei welcher die drei Teile des Gesichtsfeldes annähernd gleiche Beschattung zeigen. Jetzt schraubt man *K* fest, führt durch Drehen der Mikro-

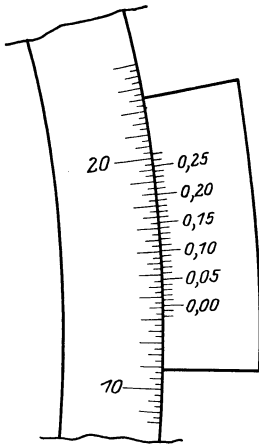


Abb. 17.

mitterschraube *m* möglichst gleiche Beschattung des Gesichtsfeldes herbei und liest am Rande der Scheibe *R* durch die Lupen an Gradteilung und Nonius die Stellung ab. Diese Bestimmung wird oft wiederholt, indem man von beiden Seiten her auf gleiche Helligkeit der Gesichtsfelder einstellt und schließlich aus allen Beobachtungen das Mittel nimmt. Dieses Mittel ist der Nullpunkt.

Nachdem man den Nullpunkt bestimmt hat, wird die Röhre mit der zu prüfenden Flüssigkeit eingelegt, das Fernrohr scharf eingestellt und nun die Bestimmung in der angegebenen Weise wiederholt. Die Differenz der beiden Ablesungen bzw. des Mittelwertes von mindestens 6 Ablesungen ergibt die

Größe des Winkels, um den die Flüssigkeit nach links oder rechts dreht.

**Ablesung der Gradteilung:** Abb. 17 zeigt den äußeren drehbaren Kreis und einen äußeren Nonius des beschriebenen Apparates. Der Nullstrich des Nonius liegt zwischen den Teilstrichen 13,50 und 13,75 des Teilkreises; der Noniusstrich 0,16 fällt mit einem Striche des Kreises zusammen, also ist abzulesen:

$$13,50 + 0,16 = 13,66^{\circ}$$

Unter spezifischer Drehung einer aktiven Substanz wird diejenige Drehung verstanden, die 1 g Substanz zu 1 cm<sup>3</sup> Lösung gelöst bei einer Rohrlänge von 1 dm bewirkt. Die spezifische Drehung wird mit  $[\alpha]$  und die auf Natriumlicht und eine Temperatur von z. B. 20° sich beziehende mit  $[\alpha]_{D}^{20}$  bezeichnet. Enthält die Flüssigkeit nur eine optisch aktive Substanz, so ist  $[\alpha] = \pm \frac{\alpha}{c \cdot l}$ , wo-

bei  $\alpha$  den beobachteten Drehungswinkel,  $c$  die Menge der Substanz in Grammen, welche in  $1 \text{ cm}^3$  der Lösung bei  $20^\circ$  enthalten ist, und  $l$  die Länge des Rohres in Dezimetern bezeichne.

Handelt es sich darum, die Änderungen der spez. Drehung bei verschiedenen Konzentrationen festzustellen, so ist es nötig, auch den Gehalt der Substanz in Grammen in  $1 \text{ g}$  der Lösung ( $p$ ) und das spez. Gewicht der Lösung ( $a$ ) bei  $20^\circ$  (bezogen auf Wasser von  $4^\circ$  als Einheit) zu kennen und die spez. Drehung  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$

nach der Formel  $\pm \frac{\alpha}{p \cdot l \cdot d}$  zu berechnen.

Kennt man die spez. Drehung der untersuchten Substanz, weiß man, daß diese sich mit der Konzentration nicht oder nur wenig ändert, und enthält die Lösung nur die eine optisch aktive Substanz, so ergibt sich aus der Drehungsbestimmung der Gehalt der Lösung an der aktiven Substanz nach der Formel  $c = \frac{100 \alpha}{[\alpha] l}$  worin  $\alpha$  die beobachtete Drehung,  $[\alpha]$  die spez. Drehung,  $l$  die Rohrlänge in Dezimetern und  $c$  das Gewicht des die Drehung bewirkenden Stoffes für  $100 \text{ cm}^3$  Lösung bedeutet.

Beispiele:

Für Traubenzucker ist  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 52,8^\circ$ , daher

$$c = \frac{1,894 \alpha}{l}, \text{ bei Anwendung einer zwei-dm-Röhre}$$

$$c = 0,947 \alpha.$$

Verwendet man Röhren von 189,4 bzw. 94,7 mm Länge, so wird einfach  $c = \alpha$ , bzw.  $c = 2\alpha$ .

Für Rohrzucker ist  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 66,5^\circ$ , daher

$$c = 1,504 \frac{\alpha_{\text{D}}^{20}}{l} \text{ bei Anwendung einer zwei-dm-Röhre}$$

$$c = 0,752 \alpha_{\text{D}}^{20}$$

Die spez. Drehung bei verschiedenen Zuckerkonzentrationen:  $p =$  Prozent;  $c = g$  in  $100 \text{ cm}^3$  Lösung.

Rohrzucker:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 66,56^\circ + 0,0008 c - 0,0002 c^2$ ; für  $10 - 25 \text{ g}$  in  $100 \text{ cm}^3$  kann man mit der konstanten Drehung  $+ 66,50^\circ$  rechnen. Andere Formeln  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 66,44^\circ + 0,01031 p - 0,0003545 p^2$  für  $p = 2$  bis  $66$  gültig oder  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 66,67 - 0,0095 c$  von  $c = 4$  bis  $28$  gültig.

Traubenzucker, *d*-Glucose:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 52,50^\circ + 0,0188 p + 0,000517 p^2$ , gültig für  $p = 1 - 18$ .

Der Traubenzucker zeigt „Mutarotation“: Gleich nach der Auflösung in kaltem Wasser zeigt  $\alpha$ -Glucose  $[\alpha]_{\text{D}}$  etwa  $+ 105^\circ$ ,



$\beta$ -Glucose etwa  $+ 22^\circ$ ; beim Stehen, rascher beim Erhitzen stellt sich bei beiden das angegebene konstante Drehungsvermögen ein. Die Temperaturempfindlichkeit von  $[\alpha]_D$  ist gering.

Fruchtzucker:  $[\alpha]_D^{20} = -91,90^\circ - 0,111 p$ ; für  $p = 2$  bis 31 gültig. Die Drehung ist temperatur- und konzentrationsempfindlich.

$[\alpha]_D^t = -100,3^\circ - 0,108 c + 0,56 t$  für  $c = 4-40$ , für  $t = 0$  bis  $+ 40^\circ$  gültig. Mutarotation; Anfangsdrehung  $-104^\circ$ .

*d*-Galaktose:  $[\alpha]_D^{20} = + 83,88^\circ + 0,0785 p - 0,209 t$ ; für  $p = 4-36$ ; für  $t = + 10$  bis  $+ 30^\circ$ . Anfangsdrehung der  $\alpha$ -Modifikation  $+ 118^\circ$ .

Milchzucker (+ 2 aq):  $[\alpha]_D^{20} = + 52,53^\circ$ , für die wasserfreie Substanz  $+ 55,30^\circ$ .

Maltose:  $[\alpha]_D^t = + 140,4^\circ - 0,0184 p - 0,095 t$ , für  $p = 4$  bis 35 und  $t = + 15$  bis  $35^\circ$  gültig.

### Refraktometrie.

Die Bestimmung beruht auf der Erscheinung der Totalreflexion. Trifft ein Lichtstrahl in einem Medium die Grenzfläche gegen ein optisch dünneres Medium, so dringt er, sobald sein Einfallswinkel eine bestimmte Größe überschreitet, garnicht in das dünnere Medium ein, sondern er wird total reflektiert. Betrachtet man die Grenzfläche im reflektierten Licht von der Seite des dichteren Mediums her, während man den Einfallswinkel des Lichtes anwachsen läßt, so sieht man bei einem bestimmten Einfallswinkel (dem „Grenzwinkel“  $\alpha$ ) die Fläche ganz plötzlich hell werden; bei diesem Winkel  $\alpha$  tritt nämlich totale Reflexion auf. Zwischen  $\alpha$  und dem Brechungsexponenten  $n$  des dünneren und  $N$  des dichteren Mediums (gegen Luft) besteht die einfache Beziehung

$$n = N \sin \alpha .$$

$N$  ist gegeben,  $\alpha$  wird gemessen; berechnet wird  $n^1$ ). Die im Okular abgelesenen Skalenteile stellen bei den meisten hier in Betracht kommenden Arbeiten das gesuchte Messungsergebnis selbst dar. Bei einigen Untersuchungen werden die abgelesenen Skalenteile in die wirklichen Brechungsindizes umgerechnet.

Der Gang der Lichtstrahlen im Refraktometer ist aus der Abb. 18 ersichtlich. Die von einem Spiegel  $S$  aufgefangenen Strahlen treten, das Prisma  $P$  streifend, in die Flüssig-

<sup>1)</sup> Vgl. Grünbaum-Lindt: Physikal. Praktikum. 3. Aufl. S. 178. 1921. — Vgl. hierzu auch Löwe, F.: Optische Messungen des Chemikers und des Mediziners. Dresden und Leipzig 1925.

keitsschicht und erfahren hier eine Ablenkung, indem sie ins Hauptprisma  $P$  eintreten. Der Winkel, den sie hier-

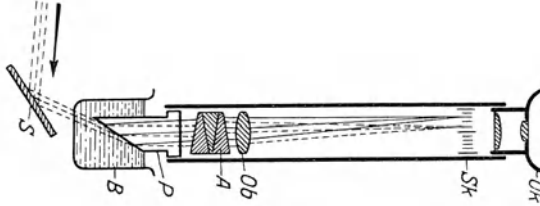


Abb. 18.

bei bilden, ist der Grenzwinkel der totalen Reflexion. Derjenige Teil der Skala, der in das Bereich dieses Winkels fällt, erscheint hell, der übrige Teil bleibt dunkel. Die Lage der Grenzlinie zwischen hell und dunkel wird in der Skala bestimmt.

Apparatur nach Pulfrich:

Außerdem Instrument selbst gehört zur Apparatur ein Wasserbad mit drehbarem Spiegel, Glasboden und Einrichtung zur Aufnahme der Flüssigkeitsbehälter (Bechergläser), in die das Refraktometer eintaucht. Das Instrument wird an dem Bügel des Wasserbades aufgehängt (Abb. 19).

Das Eintauchrefraktometer selbst besteht im wesentlichen aus folgenden Teilen:

1. dem Prisma  $P$ ,
2. dem aus dem Objektive  $Ob$  und dem Okulare gebildeten Fernrohr mit der Skala  $Sk$  und einer Mikrometerschraube  $Z$ ,
3. dem zwischen dem

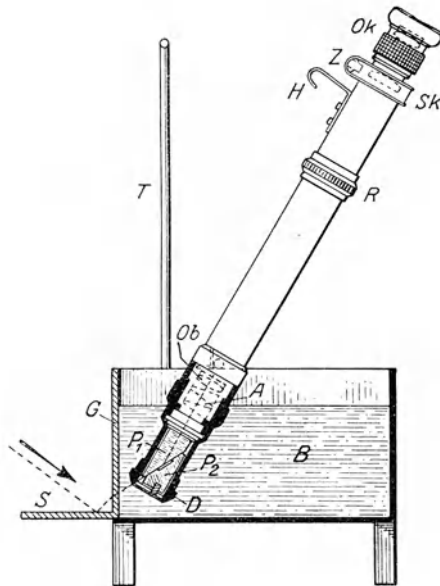


Abb. 19. Untersuchung einer Flüssigkeit unter Luftabschluß mit dem Eintauchrefraktometer ( $\frac{1}{5}$  nat. Größe). Die Substanz ist zwischen dem Prisma  $P_1$  und dem Hilfsprisma  $P_2$  in dem metallenen Becher enthalten. Das vom hellen Himmel oder einer Lampe kommende Licht fällt auf den Spiegel  $S$  und tritt durch die matte Glasplatte  $G$  in das Wasserbad, von da durch das Fenster des Deckels  $D$  in die Substanz, und schließlich in das Refraktometer, das durch die Einrichtung des Troges  $B$  in der schrägen, zum Beobachten bequemen Lage gehalten wird.



(Fortsetzung der Tabelle auf S. 24).

Skalenteil	$n_D = 1,3$		Skalenteil	$n_D = 1,3$	
65	52 05		85	59 30	
66	52 42		86	59 86	
67	52 79		87	60 02	
68	53 16		88	60 38	
69	53 52		89	60 74	
70	53 88		90	61 09	
71	54 25		91	61 45	
72	54 61	36	92	61 81	53
73	54 97		93	62 17	1 3,5
74	55 33	1 3,6	94	62 52	2 7,0
		2 7,2			3 10,5
75	55 69	3 10,8	95	62 87	4 14,0
76	56 06	4 14,4	96	63 23	5 17,5
77	56 42	5 18,0	97	63 59	6 21,0
78	56 78	6 21,6	98	63 94	7 24,5
79	57 14	7 25,2	99	63 94	8 28,0
80	57 50	8 28,8	100	64 64	9 31,5
81	57 86	9 32,4	101	65 00	
82	58 22		102	65 35	
83	58 58		103	65 70	
84	58 94		104	66 05	
			105	66 40	

Beispiel: Ein Methylalkohol zeige den Skalenteil 8,7 an; dieser entspricht dem Brechungsindex  $n_D = 1,33049 + 0,7 \times 38$  Einheiten der fünften Dezimale. Aus dem Interpolationstäfelchen für 38 entnimmt man  $0,7 \times 38 = 26,6$ ; also ist  $n_D = 1,33049 + 0,00027 = 1,33076$ .

Durch Drehen an *Z* verschiebt man die Skala gegen die Grenzlinie, bis der soeben notierte Skalenteil sich mit der Grenze deckt. Der Index der Mikrometertrommel zeigt alsdann die Zehntel-Skalenteile an, die zu dem Ganzen noch hinzuzufügen sind.

Handhabung und Justierung: Man stelle den Temperier-trog so auf, daß der Spiegel dem hellen Himmel zugewandt ist; dann füllt man den Trog reichlich zur Hälfte mit Leitungswasser und stellt ein mit destilliertem Wasser gefülltes Becherglas in eines der Löcher in der über dem Spiegel angeordneten Reihe<sup>1)</sup>. Schließlich hängt man das Refraktometer mit einem Haken *H* an den Bügel, so daß das Prisma I ganz in das Becherglas eintaucht.

Nunmehr überläßt man das Ganze zum Ausgleich der Temperatur etwa 10 Minuten sich selbst. Hat das destillierte Wasser genau die Temperatur des Bades angenommen, so stellt man das

<sup>1)</sup> Im wesentlichen nach Hoppe-Seyler-Thierfelder: S. 31.

Okular durch Drehen an dem gerieften Rande der Okularmuschel auf größte Deutlichkeit der Zahlen und Striche der Skala ein und richtet den Spiegel so, daß man den Schein des hellen Himmels durch das Becherglas hindurchsieht. Der obere Teil des Gesichtsfeldes von 0 bis ca. 15 erscheint jetzt hell und ist von dem unteren,

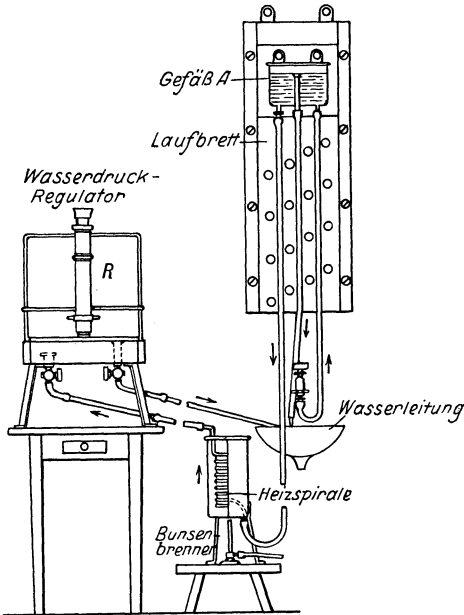


Abb. 20 (etwa  $\frac{1}{20}$  nat. Größe).

Aufstellung der Heizspirale und des Wasserdruckregulators in Verbindung mit dem Refraktometer R. Die Pfeile geben die Richtung des fließenden Wassers an. Der Deutlichkeit halber sind die Füße des Temperiertrogs übertrieben hoch gezeichnet. Aus demselben Grunde fehlt in der Abb. der Beleuchtungsspiegel. Durch einen vollen Kreis ist der Pflock bezeichnet, auf dem das Gefäß A tragende Brett ruht.

dunklen Teil durch eine scharfe Grenze getrennt; ein farbiger Saum ist durch Drehung am Ring R zu beseitigen. Man liest an der scharf eingestellten Skala nun ab, und notiert außerdem die Temperatur des destillierten Wassers. Die Justiertabelle lehrt alsdann, ob das Refraktometer richtig justiert ist.

Das justierte Refraktometer mit Prisma I zeigt für destilliertes Wasser folgende Refraktometerwerte an: (Tabelle S. 27).

Weicht das Mittel mehrerer sorgfältiger Ablesungen von der in der Tabelle enthaltenen Justierzahl um mehr als 0,1 Skalenteile ab, so verfähre man folgendermaßen.

Man umfaßt mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand das Okularende des am Bügel hängenden Refraktometers, stellt die Mikrometertrommel auf 0 und dreht die vernickelte geränderte Mutter im Sinne der zunehmenden Trommelteile, wodurch sie gelöst wird. Jetzt liest man die Temperatur im Becherglase nochmals ab, um sich zu überzeugen, daß sie konstant geblieben ist, und entnimmt aus der Tabelle die zu der abgelesenen Temperatur gehörige „Justierzahl“. Durch Drehen an der vernickelten geränderten Stellenscheibe

bringt man die Grenzscheibe genau auf den gleichen Skalenteil, den die Justierzahl ergibt, und dreht schließlich die jetzt lose Mikrometertrommel so, daß der Index die Zehntel der Justierzahl anzeigt. Nun hält man mit dem Daumen und Zeigefinger der linken Hand die Trommel, die Scheibe und den Index fest, und zieht mit der rechten die Mutter wieder fest an, ohne daß sich die Stellung der Trommel zu ihrem Index ändert.

Schließlich prüft man die neue Justierung.

Temperaturregulierung: Um die gewöhnlich benutzte Temperatur von 17,5° bei den Untersuchungen einzuhalten, ist eine peinliche Regulierung des Warmwasserzuflusses nötig. Im allgemeinen wird man mit öfterem Nachfüllen von Wasser etwas höherer Temperatur auskommen. Besser wirkt ein dauernd wirkender Wasserdruckregulator mit Heizvorrichtung. Dabei tritt das Wasser aus einem Vorratsgefäß durch eine Kupferspirale, die in einem Wasserbad vorgewärmt wird, wie die Abb. 20 zeigt.

Zur Untersuchung kleinerer Substanzmengen (Blutserum) oder gefärbter Flüssigkeiten bedient man sich des Hilfsprismas (vgl. Abb. 19, S. 23). Dazu wird ein beigegebener metallener Becher auf das Refraktometer aufgesteckt und der Bajonettverschluß fest angezogen. Darauf bringt man einige Tropfen der Flüssigkeit auf die horizontal gehaltene Hypotenusenfläche des Hilfsprismas, schiebt dieses in den Becher ein und setzt den Deckel des Metallbechers auf. Die Hypotenusenfläche des Hilfsprismas soll auf die polierte, elliptische Fläche des Refraktometers zu liegen kommen. Man soll so viel Flüssigkeit nehmen, daß der Zwischenraum zwischen den Prismen ganz ausgefüllt ist. Die übrige Handhabung ist die gleiche wie oben beschrieben. Zur Beobachtung der Refraktion unter Benutzung des Hilfsprismas ist eine besonders konstruierte Blendvorrichtung, die dem Apparat mitgegeben wird, sehr nützlich.

Refraktometerwerte für reines Wasser bei verschiedenen  $t$  (Justiertabelle).

Bei der Temperatur	10	11	12	13	14	15	16	17	17,5	18	19
die Skalenteile	16,13	16,15	16,0	15,85	15,7	15,5	15,3	15,1	15,0	14,9	14,7
Bei der Temperatur	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
die Skalenteile	14,5	14,25	14,0	13,75	13,5	13,25	13,0	12,7	12,4	12,1	11,8

Kupelwieser<sup>1)</sup>, dem wir sehr eingehende Untersuchungen über die Verwendbarkeit des Refraktometers verdanken, benutzt als Lichtquelle statt Tageslicht eine in 35 cm vom Beleuchtungsspiegel aufgestellte, sorgfältig abgeblendete Glühlampe von 100 Kerzen. Ein Temperaturfehler von  $\pm 0,5$  verursacht beim Serum einen Fehler in  $n_D$  von 0,00002.

Die Refraktometrie wurde bei den Fermenten bis jetzt hauptsächlich bei der Untersuchung über die Abwehrfermente von Abderhalden angewandt<sup>2)</sup>.

### Interferometrie<sup>3)</sup>.

Bei der Interferometrie werden die refraktometrischen Messungen mit Hilfe der Interferenz des Lichtes ausgeführt.

Die Messungen mit dem Flüssigkeitsinterferometer, das von F. Loewe konstruiert und von C. Zeiß in Jena hergestellt wird, beruhen darauf, daß durch den Unterschied der Lichtbrechung bzw. Konzentration einer zu untersuchenden Lösung und einer Vergleichslösung Interferenzstreifen wandern. Die Messung mit dem Interferometer ist eine Differenzmethode, bei der das Interferenzbild der zu untersuchenden Lösung verglichen wird mit einer unveränderlichen normalen Interferenzerscheinung, die als Nullage dient. Die Wanderung der Interferenzstreifen läßt sich durch eine Kompensationsvorrichtung ausgleichen und ihre Größe messen. Die Einrichtung des Flüssigkeitsinterferometers wird am leichtesten an Hand der schematischen Darstellung (Abb. 21) verständlich sein.

Der Beleuchtungsapparat *B*, bestehend aus einem Osramlämpchen und einem Linsensystem, ist in einem kleinen Tubus neben dem Fernrohre untergebracht. Der Faden des Lämpchens wird quer auf einem Spalt abgebildet. Der aus diesem Spalt her austretende Lichtstrahl fällt auf den am hinteren Ende des Apparates angeordneten, mit Justiereinrichtungen reichlich ausgestatteten Spiegel *S*. In oder dicht an dieser Spiegelebene liegen zwei Doppelblenden, welche die Beugungserscheinungen hervorrufen.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 413. 1922. — Vgl. auch Meyer, H.: Biochem. Zeitschr. Bd. 114, S. 194. 1921.

<sup>2)</sup> Pregl, F. u. M. de Crinis: Fermentforschung Bd. 2, S. 58. 1917. — Über andere Anwendungen vgl. Rostock, P.: (Pepsinwirkung auf Fibrin) Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 39, S. 385. 1924 und Bd. 42, S. 132. 1924. — Reiß, E.: (Pepsinbestimmung im Magensaft) Schweiz. med. Wochenschr. Bd. 29, III. 1923. — Kupelwieser, E. u. O. Rösler: (Magensaft) Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 38. 1923.

<sup>3)</sup> Nach Hirsch: Abderh. Reaktion mittels der interferom. Methode. Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 28 u. 29. — Vgl. auch Löwe, F.: l. c.

Der nahezu senkrecht auffallende Lichtstrahl wird von dem Spiegel zurückgeworfen und durch das Objektiv des Fernrohres zu einem Interferenzbilde vereinigt. Das Interferenzbild liegt dabei dicht neben dem sehr fein einstellbaren Spalt und wird mittels des Okulars *Ok* betrachtet. Die Lichtstrahlen der parallelen Strahlenbündel müssen auf ihrem Wege zum und vom Spiegel *S* durch die Platten *P*<sub>1</sub> und *P*<sub>2</sub> des Kompensators *K*, ferner durch die planparallelen Platten eines Temperierbades *Tr*, durch die Temperierflüssigkeit selbst und durch die in das Temperierbad von oben eingehängten, mit zwei planparallelen Glasplatten versehenen und mit den zu untersuchenden bzw. zu vergleichenden Flüssigkeiten gefüllten Flüssigkeitskammern hindurchtreten. Nur die obere Hälfte der Lichtstrahlen nimmt diesen Weg. Die untere Hälfte des Lichtbündels geht unter der Flüssigkeitskammer her und erzeugt in dem Okular das unveränderliche als Nulllage dienende Interferenzstreifensystem.

Dieses besteht aus einem weißen Felde, dem sog. Maximum nullter Ordnung, und symmetrisch dazu angeordneten Beugungserscheinungen, welche durch sehr schmale schwarze Minimastrifen getrennt sind.

Befinden sich in den beiden Hälften der Doppelkammern Flüssigkeiten von genau gleicher Lichtbrechung, mit anderen Worten Flüssigkeiten von gleicher Konzentration, so erzeugt die obere Hälfte des parallelen Strahlenbüschels genau dasselbe Beugungsspektrum, wie die untere. Sind jedoch die Kammern mit verschiedenen Substanzen gefüllt, so ist die Interferenzerscheinung gegen ihre bisherige Lage verschoben, da die optische Weglänge in beiden Kammern eine verschiedene ist. Durch Drehen der Schraube *M* kann man die beweglich angeordnete Platte *P*<sub>1</sub> des Kompensators *K* verstellen, wodurch der optische Gangunterschied der beiden Hälften des Strahlenbüschels ausgeglichen wird. Man dreht so lange, bis die beiden oben erwähnten schwarzen Streifen, die das Maximum nullter Ordnung (das Weiße) begrenzen, in dem oberen und unteren Bilde genau auf Koinzidenz stehen.

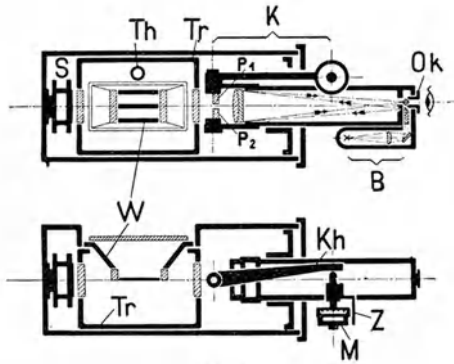


Abb. 21.



Die Schraube *M* trägt eine Meßtrommel, deren Umdrehungen man mit Hilfe ihrer Teilung, sowie eines Umdrehungszählers *Z* ablesen kann. *Th* ist ein Tubus für ein Thermometer. Die Flüssigkeitskammern sind so konstruiert, daß sie auf das bequemste gefüllt und gereinigt werden können. Die Flüssigkeit ist gegen Verdunsten durch einen Glasdeckel geschützt und befindet sich, wie bereits oben erwähnt, zwecks Temperaturkonstanz in einem Temperierbade. Als Temperierflüssigkeit dient destilliertes Wasser.

Zur Untersuchung mit dem Interferometer werden die beiden Hälften der Doppelkammer mit destilliertem Wasser gefüllt und der Nullpunkt festgestellt. Dann werden die Flüssigkeitskammern ausgehebert und sorgfältig mit Filtrierpapier ausgetrocknet. Die letzten Spuren von Feuchtigkeit werden durch ein über ein Holzstäbchen gewickeltes Wattebäuschchen entfernt. Durch Nachreiben mit einem frischen Gazebäuschchen entfernt man etwaige Wattefäserchen, die an den Glasplatten der Kammern noch haften. Ein Befeuchten der Kammern mit Alkohol, Toluol und ähnlichen harzlösenden Substanzen ist absolut unzulässig. Nun werden die auf diese Weise gereinigten Kammerhälften mit den zu untersuchenden Flüssigkeiten gefüllt [die zu untersuchende Lösung auf die Seite, an der sich die Meßtrommel des Interferometers befindet], die andere Hälfte wird mit der Vergleichslösung angefüllt. Mit der eigentlichen Messung, d. h. mit dem Einstellen der beiden Beugungserscheinungen auf Koinzidenz, muß man so lange warten, bis die Temperatur zwischen den gefüllten Kammern und dem Temperierbad ausgeglichen ist. Dies dauert meist nur wenige Minuten. Ist der Ausgleich noch nicht beendet, so sind die Streifen des veränderlichen Systems entweder krumm, oder sie verlaufen schräg zu denen des unveränderlichen Interferenzbildes. Beim Untersuchen von Serum muß zur Reinigung erst mit einer 0,8 proz. Kochsalzlösung und dann erst mit destilliertem Wasser gespült werden, da Serum, mit Wasser versetzt, Trübungen hervorruft. Von dem bei dem eigentlichen Versuch an der Meßtrommel abgelesenen Wert in Trommelteilen wird die Nullage der Kammer, d. h. der bei der Füllung der beiden Kammerhälften mit destilliertem Wasser abgelesene Wert, abgezogen.

Benutzt wurde die Methode zum Studium der Abderhaldenschen Abwehrfermente im Blut<sup>1)</sup>.

### Nephelometrie.

Nephelometrie oder Trübungsmessung ermittelt aus der Trübung einer Lösung ihre Konzentration an trübender Substanz.

<sup>1)</sup> Hirsch, P.: l. c.

Die Nephelometrie ist besonders geeignet zur Bestimmung geringer Substanzmengen. Sie ist zur Fermentuntersuchung, wo es darauf ankommt, große Reihen möglichst schnell zu messen, besonders brauchbar.

Prinzip: Gemessen wird die Trübung einer zu untersuchenden Lösung gegen eine bekannte Trübung (resp. bekannte Konzentration) oder auch gegen einen käuflichen empirisch festzulegenden Trübungsstandard. Unter den unten ausgeführten Bedingungen gilt die Beziehung, daß eine Trübung direkt proportional der Konzentration an trübender Substanz ist. Hierbei wird nicht, wie bei der Colorimetrie, das durch die Lösung hindurchgesandte Licht gemessen, also die Menge des adsorbierten Lichts, sondern das von den Teilchen ausgesandte abgebeugte Licht. Durch Änderung der Höhe der Flüssigkeitssäule, die das Tyndalllicht aussendet, wird dessen Stärke proportional zur Höhe geändert.

Apparatur: Hier soll nur eines der käuflichen Nephelometer das nach Kleinmann<sup>1)</sup>, [hergestellt von Schmidt und Haensch, Berlin] beschrieben werden. Abb. 22 zeigt das Schema des Strahlenganges, Abb. 23 das Schema des Instrumentes selbst.

$a$  und  $a_1$  sind Reagensgläschen von 12 cm<sup>3</sup> Fassungsvermögen, die zur Aufnahme der zu vergleichenden Trübungen dienen. Dieselben werden von vorn, senkrecht zur Rückseite der Zeichenebene bei Abb. 23, beleuchtet und die entsprechenden Tyndallkegel von oben beobachtet. Zu diesem Zwecke geht das Beugungslicht zuerst durch zwei massive Glaszylinder  $b_1$  und  $b_2$ . Sie dienen dem Zwecke, den Fehler, der durch Beobachtung der Oberfläche entsteht, zu vermeiden, dadurch, daß sie in die untersuchte Flüssigkeit eintauchen. Das Licht durchläuft dann eine Optik und gelangt im Okular zur Beobachtung, in dem die Hälfte des Gesichtsfeldes je einer trübenden Flüssigkeitssäule entspricht.

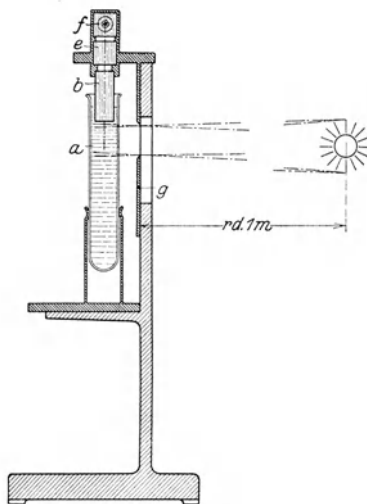


Abb. 22.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 99, S. 115. 1919.

Die Höhen der dem Licht ausgesetzten Gefäße können mittels einer einfachen Schraubenbewegung, beliebig geändert werden dadurch, daß durch bewegliche Metallplatten  $g$  und  $g_1$  die Länge der Fenster, die in die den Apparat frontal deckende Metallplatte geschnitten sind, verändert wird. Ihre Stellung und somit die Länge der beleuchteten Flüssigkeitshöhe ist durch eine Millimeter-skala und Nonius auf 0,1 mm genau abzulesen.

Zur Beleuchtung des Apparates dient eine 150—200kerzige mattierte Osramlampe, die in einer Entfernung von mindestens 75 cm vor dem Apparat in gleicher Höhe wie die Fenster aufgestellt wird.

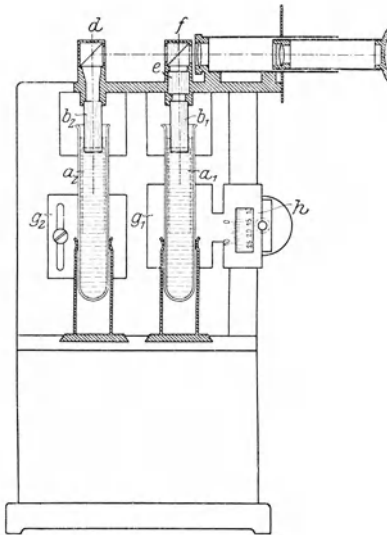


Abb. 23.

Die Mikronephelometer-einrichtung stellt einen Zusatzteil zu dem Nephelometer nach Kleinmann dar, die einfach eingefügt werden kann. Sie dient dazu, statt der Gefäße von 12 cm<sup>3</sup> Fassungsvermögen solche von 2,0 und 1,5 cm<sup>3</sup> Volumen anzuwenden.

Allgemeine Vorschriften für die Nephelometrie: a) Die zu vergleichenden Lösungen müssen für die Zeit ihres Vergleichs einen konstanten Trübungsgrad besitzen und dürfen keine Änderung, wie Ausflockung usw., erleiden.

b) Die Trübungen, die gemessen werden, müssen für das Auge völlig homogen sein. Auch ihre Dichte muß sich in empirisch festgelegten Grenzen halten. Ist die Trübung zu gering, so leidet die Helligkeit und Genauigkeit der Messung. Ist sie allzu stark, so kommt es leicht zu Ausflockungen. Die innezuhaltenden Konzentrationsgrenzen, Angaben über Haltbarkeit usw. sind in den einzelnen Vorschriften genau angegeben.

c) Das Verhältnis der Trübungen, die miteinander verglichen werden, soll hinsichtlich ihrer Trübungen oder Konzentrationen ein Verhältnis von 1:4 nicht übersteigen. Praktisch folgt daraus die Vorschrift, die zu vergleichenden Trübungen möglichst gleichstark zu bemessen.

d) Die Trübungen, die untereinander verglichen werden, sollen gleiche Teilchengröße haben.

Handhabung des Apparates. Die Lichtquelle wird in 75 cm Entfernung in möglichst gleiche Höhe und symmetrische Stellung zu den Nephelometerfenstern gebracht.

Die Messungen werden im Dunkelzimmer ausgeführt.

Die Reagensgläser werden mit der gleichen trüben Lösung gefüllt, rechtes und linkes Fenster werden gleichgestellt und durch vorsichtiges Rücken des Apparates und der Lichtquelle gleiche Helligkeit im Gesichtsfeld erzielt. Sodann werden  $a_1$  und  $a_2$  miteinander vertauscht und, falls das Gesichtsfeld unverändert bleibt, die Stellungen des Apparates und der Lichtquelle auf dem Tisch markiert, am einfachsten durch Kreide- oder Buntstiftstriche. Zeigt sich nach dem Umtauschen der Zylinder das Gesichtsfeld nicht mehr einförmig hell, so muß die Einstellung solange verrückt werden, bis der Umtausch keine Veränderung mehr ergibt. Nunmehr ist der Apparat zum Arbeiten fertig. Die Gefäße werden in die Metallhülsen heruntergedrückt und mitsamt diesen aus der Schiene herausgenommen. Sodann werden sie mit einem Leder sehr sorgfältig von außen geputzt. Sie innen zu reinigen und auszutrocknen, empfiehlt sich nur nach Abschluß der gesamten Arbeit. Durch Reinigung mit Bürsten und Tüchern bleiben stets kleine störende Fäserchen zurück. Es ist daher ratsam, sie mit der zu untersuchenden Lösung nur gründlich auszuspülen. Mit der Lösung gefüllt, werden sie wieder in die Schienen gebracht, worauf die Gläser hochgezogen werden, bis der kompakte Glaszylinder in sie eintaucht. Sehr sorgsam ist auf dessen Reinhaltung zu achten, da Verunreinigungen leicht zu einer Veränderung des kolloidalen Zustandes der Lösung führen. Auch darauf muß geachtet werden, daß beim Eintauchen der kompakten Glaszylinder in die Lösung keine Luftblasen unter dieselbe geraten oder sich bei einer evtl. Erwärmung der Lösung im Zimmer unter ihnen festsetzen.

Nach Festlegung der Stellung des einen Fensters wird das andere durch den Trieb eingestellt, bis im Gesichtsfeld gleiche Helligkeit erzielt ist. Das Verhältnis der Fensterhöhen ist umgekehrt proportional den Konzentrationen.

Bei der Beobachtung spielen die subjektiven Fehler eine große Rolle. Es ist unumgänglich notwendig, das Auge sich 5—10 Minuten an die Dunkelheit adaptieren zu lassen. Aber auch während der Reihenuntersuchungen ist es ratsam, das Auge im Dunkeln zuweilen ausruhen zu lassen. Jede Einstellung soll mehrere Male vorgenommen werden. Von den einzelnen Ablesungen ist

das Mittel zu nehmen. Unbedingt notwendig aber ist, wie noch einmal betont werden soll, den Apparat, wenn seine Stellung zum Beleuchtungsapparat auch festgelegt ist, vor seinem Gebrauch durch Einfüllen gleicher Lösungen in beide Zylinder auf Fehlerlosigkeit der Aufstellung zu prüfen.

Der durchschnittliche Fehler beträgt ca. 1%, der sich bei einiger Übung des Untersuchers sogar bis auf 0,5% vermindert.

Die Berechnung der Resultate erfolgt im allgemeinen nach dem Gesetz der Proportionalität. Ist  $a$  der Nephelometerwert der bekannten Lösung, den man gewöhnlich auf den Mittelwert 20 annehmen wird,  $a_1$  die Stellung der unbekanntes Lösung bei gleicher Helligkeit im Gesichtsfelde,  $c$  die Konzentration der bekannten Lösung,  $x$  die der unbekanntes, so ist  $a : a_1 = x : c$ , also

$$x = \frac{c \cdot a}{a_1}.$$

Die Nephelometrie wurde bis jetzt bei der Untersuchung der Diastase (S. 172), des Pepsins (S. 224) und des Trypsins (S. 258) angewandt.

### Colorimetrie.

Prinzip: Das Lichtabsorptionsvermögen zweier Lösungen derselben Substanz ist das gleiche, wenn die Konzentration dieser Lösungen umgekehrt proportional den Schichtdicken ist. Die Schichthöhe und Konzentration der einen Lösung (Vergleichslösung) ist bekannt, die Schichthöhe der zu untersuchenden Lösung wird abgelesen und daraus ihre Konzentration berechnet. Ist  $c$  die Konzentration der zu untersuchenden Lösung,  $c_1$  die Konzentration einer Lösung bekannten Gehalts, und sind  $s$  und  $s_1$  die Schichtdicken der Lösungen, wenn die Farbtiefen beider dem Auge gleich erscheinen, so ist  $c : c_1 = s_1 : s$ . Daraus berechnet sich

$$c = \frac{c_1 \cdot s_1}{s}.$$

#### Colorimeter nach Duboscq<sup>1)</sup>.

Es besteht aus zwei nebeneinanderstehenden zylindrischen Röhren Z, von denen die eine die Lösung bekannten Gehalts, die

<sup>1)</sup> Beschreibung nach Hoppe-Seyler-Thierfelder: S. 20, Abb. 2 u. 3.

andere die zu bestimmende Lösung enthält<sup>1)</sup>. Die Schichthöhe der Flüssigkeiten kann durch die Tauchzylinder *T*, welche unten durch eine Glasplatte verschlossen sind und mittels Triebsschrauben *S* in der Flüssigkeit auf- und abbewegt werden können, verändert und an einer Skala abgelesen werden. Das Licht (Tageslicht oder Auerlicht), wird durch einen Spiegel von unten in den Zylinder reflektiert und gelangt durch ein optisches System ins Auge.

Colorimeter nach dem Duboscq-Prinzip mit aufmontierter Lichtquelle konstruieren neuerdings Schmidt und Haensch (Berlin).

Ausführung: Die Lichtquelle und der Spiegel werden bei ungefüllten Zylindern so gestellt, daß die beiden Gesichtshälften gleich hell erscheinen. Nun bringt man die Flüssigkeiten ein, stellt die Vergleichslösung auf eine bestimmte willkürliche Skalen-

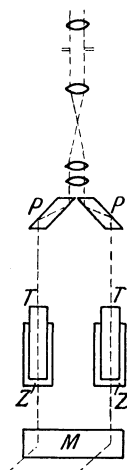


Abb. 24.

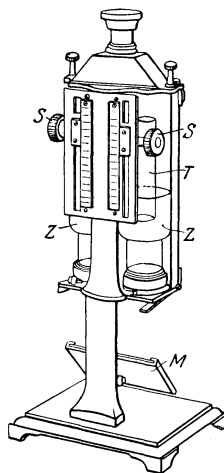


Abb. 25.

stellung und stellt durch Heben oder Senken auf Seite der zu prüfenden Lösung wieder auf gleiche Helligkeit ein. Man nimmt aus einer Reihe von Beobachtungen das Mittel. Die Berechnung geschieht mit Hilfe obiger Formel. Der Unterschied der Schichtdicke beider Flüssigkeiten, der Vergleichs- und der unbekanntes Lösung, darf nicht zu groß sein. Es darf kein nennenswerter Temperaturunterschied (höchstens bis 3<sup>o</sup>) zwischen den beiden Flüssigkeiten bestehen. — Vor der Ausführung der eigentlichen Untersuchung soll in beide Röhren *Z* die gleiche Lösung gefüllt werden. Bei fehlerlosem Apparat und richtiger Einstellung müssen bei gleichen Helligkeiten gleiche Schichthöhen auf beiden Seiten abgelesen werden.

Ein ausgezeichnetes Colorimeter ist von Bürker angegeben worden<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Als Eichflüssigkeiten für die Prüfung des Apparates sind am besten Verdünnungen von Zeichentuschen (z. B. Günther und Wagners Tuschen: „Zinnober“, „Ultramarin“, „Hellgrün“) von ca. 0,1 Vol.-% geeignet.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 36, S. 427. 1923.

## Chromophotometer nach Plesch (von Schmidt-Haensch)

## Apparat:

Das Chromophotometer (siehe Abb. 26) besteht zunächst aus einer auf der Grundplatte 1 angeordneten Kammer 2, die an der Vorderseite eine Milchglasplatte 3 trägt, durch welche das Licht

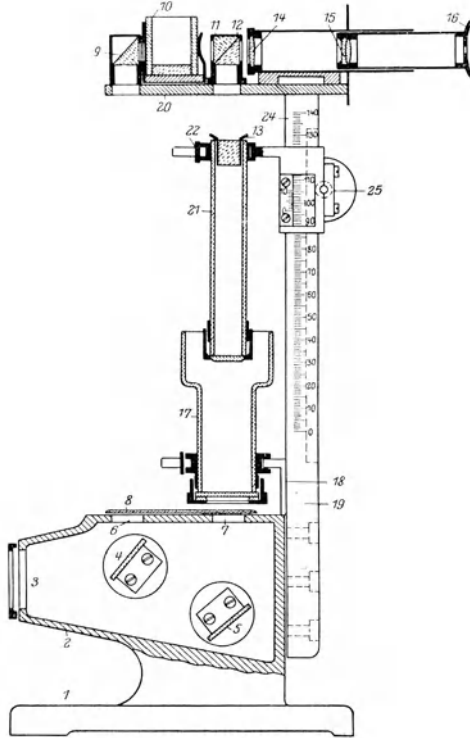


Abb. 26.

in den Raum 2 gelangt und hier zwei hintereinanderliegende Spiegel 4, 5 beleuchtet. Die reflektierende Fläche dieser Spiegel liegt in einem Winkel von ungefähr  $45^\circ$ , so daß zwei Lichtbündel reflektiert werden, die aus der Kammer 2 durch Öffnungen 6, 7, die durch eine gemeinsame Glasplatte 8 bedeckt sind, herausstrahlen. Das von dem ersten Spiegel 4 erzeugte Lichtbündel gelangt auf ein Prisma 9, um hier rechtwinklig reflektiert zu werden. Die reflektierten Lichtstrahlen gehen zunächst durch die mit der Farblösung gefüllte Teströhre 10,

so daß der Lichtstrahl die Färbung der Testflüssigkeit erhält. Der gefärbte Lichtstrahl fällt nun in den Lummer-Brodhunschen Würfel. Der Lummer-Brodhunsche Würfel besteht aus zwei Prismen, deren Hypotenusenflächen aneinander gekittet sind. Das eine Prisma hat in der Mitte auf der Hypotenusenfläche eine kreisrunde, matte Fläche 12. Diejenigen Lichtstrahlen, die auf den mittleren Teil 12 fallen, werden senkrecht nach oben reflektiert, dagegen gehen diejenigen Lichtstrahlen, die seitlich von der matten Fläche auffallen, frei durch den Würfel und werden über die Linsen 14, 15 dem Augendeckel 16 zugeführt, so daß das Auge des Beschauers eine beleuchtete gefärbte Fläche in Form eines Kreises erblickt, dessen Mitte freibleibt.

Das zweite von dem Spiegel 5 der Kammer 2 reflektierte Lichtbündel gelangt, nachdem es die Öffnung 7 der Kammer 2 verlassen hat, in die zu untersuchende Flüssigkeit, die sich in einem Glasrohr 17 befindet, durchläuft dieselbe und gelangt ebenfalls in den Lummer-Brodhunschen Würfel 11. Von diesem Lichtbündel werden diejenigen Strahlen, welche auf den Teil des Würfels seitlich zur matten Fläche 12 auftreffen, durch den Würfel hindurchgehen, also im Gesichtsfeld nicht sichtbar sein, während diejenigen Lichtstrahlen, die auf die matte Fläche 12 fallen, rechtwinklig reflektiert werden und ebenfalls in den Augendeckel 16 gelangen. Sie beleuchten die obenerwähnte, von den anderen Strahlen freigelassene Mitte des Kreises. Letztere beleuchtete ebenfalls kreisförmige Fläche liegt konzentrisch innerhalb des erstgeschilderten Kreises. Das rohrförmige Glas 17, das die zu untersuchende Flüssigkeit enthält, ist mit einem Bügel 18 an dem Ständer 19 starr befestigt, der seinerseits an der Hinterseite der Kammer 2 angeordnet ist und am oberen Ende eine Platte 20 trägt, die in der aus der Abbildung ersichtlichen Weise das Prisma 9, die Teströhre 10, den Lummer-Brodhunschen Würfel 11, den Tubus 16 und die optische Korrektion 13 aufnimmt.

Innerhalb des erstgenannten rohrförmigen Glases 17 ist ein zweites Rohr 21 angeordnet, welches in einem Bügel 22 sitzt, der auf dem Ständer 19 mittels eines Zahnstangengetriebes 23 nach Maßgabe einer Skala 24 in der Höhe verstellt werden kann. Je mehr dieses Rohr 21 in die in dem Rohr 17 befindliche zu untersuchende Flüssigkeit eintaucht, wird die Schichthöhe dieser Flüssigkeit, die von dem von Spiegel 5 reflektierten Lichtbündel zu durchlaufen ist, verringert, so daß man durch Verstellung dieses Rohres 21 mittels des Getriebes 23 die Schichthöhe so lange ändern kann, bis die beiden im Augendeckel sichtbaren Kreise die gleiche



Färbung besitzen. Die jeweilige Verstellung wird an der Skala 24 abgelesen, so daß hieraus ohne weiteres der Färbungsunterschied der zu untersuchenden Flüssigkeit, gegenüber der in der Teströhre, festgestellt werden kann.

Das colorimetrische Prinzip des Apparates. Gießen wir in den Zylinder 17 dieselbe Flüssigkeit, mit welcher die Röhre 10 gefüllt ist, so wird bei der bestehenden gleichen Belichtung Farbgleichheit des Gesichtsfeldes dann eintreten, wenn die Verschußplatte des Tauchzylinders von dem Boden des Tauchtroges genau soweit entfernt ist, als die Röhre 10 lang ist, d. h. die Schichtdicken gleich sind. Die dem Apparat beigegebene Röhre 10 ist 20 mm lang, somit wird bei gleich konzentrierten Farblösungen der Nonius 20 mm Schichtdicke zeigen müssen. Ist die untere Schichtdicke größer als 20 mm, so wird auf diesem Wege weniger Licht durchdringen können als auf dem Wege durch die Teströhre, der innere Ring wird dunkler sein. Ist hingegen die Schichtdicke unten kleiner als 20 mm, so wird der innere Ring heller als der äußere erscheinen. Ebenso verhält es sich bei derselben Schichtdicke, aber verschiedener Konzentration der Flüssigkeiten. Ist die Flüssigkeit im Tauchtrog 17 weniger konzentriert als die in der Röhre 10 befindliche, so wird die Schichtdicke im Tauchtrog größer als 20 mm sein müssen, um Gleichheit im Gesichtsfelde hervorzurufen; ist sie konzentrierter, so wird die Schichtdicke geringer als 20 mm sein.

Die gesuchte Konzentration ist aus der Formel auf S. 34 unten leicht zu berechnen.

### Konduktometrie.

Der Widerstand (bzw. sein reziproker Wert: die Leitfähigkeit) einer zu messenden Lösung wird mittels einer Wheatstoneschen Brückenordnung gemessen. Die Stromlosigkeit der Brücke wird durch ein Telephon konstatiert.

Apparatur<sup>1)</sup>: Die Schaltung ist aus der Abb. 27 ersichtlich. In der Abbildung bedeutet *A* einen 2-Volt-Akkumulator, dessen Pole über das kleine Induktorium *I* und einen regulierbaren Gleitwiderstand, (man braucht nur wenige Ohm), mittels eines Stromschlüssels geschlossen werden können. Der Vorschaltwiderstand wird derart eingestellt, daß gerade eben noch das Induktorium mit dem Wagnerschen Hammer in Betrieb gehalten werden

<sup>1)</sup> Im wesentlichen nach Michaelis: Praktikum, 2. Aufl., S. 137.

kann; je schwächer der Strom, desto besser. Die Klemmschraubepole des Sekundärstromes werden wie in der Zeichnung geschaltet.  $R$  ist ein Rheostat von mindestens 1—1000 Ohm (für schlechtleitende Flüssigkeiten braucht man bis 10000 Ohm).  $W$  ist der zu messende Widerstand in dem Widerstandsgefäß (s. unten).  $ab$  ist ein dünner, auf einem in Millimeter geteilten Maßstab von 1 m Länge ausgestreckter Draht aus Platin-Iridium oder aus Konstantan<sup>1)</sup>,  $d$  ist ein Gleitkontakt,  $T$  ein Telephon. Das Induktorium wird von einem Kasten überdeckt, damit sein Ton nicht direkt hörbar ist.

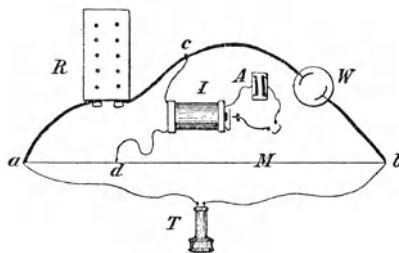


Abb. 27.

$R$  kann man beliebig wählen, doch wird man ihn möglichst so groß nehmen, daß der Schleifkontakt nicht zu weit von der Mitte der Meßbrücke entfernt ist, wenn das Telephon schweigt; dann sind die Fehlerquellen am kleinsten. Als Rheostat dient ein geeichter Stöpselrheostat. Das Induktorium soll klein sein; am besten ist eins der gewöhnlichen Schlitteninduktorien, wie sie in der Reizphysiologie gebraucht werden. Die Feder des Unterbrechers soll sehr schnelle Schwingungen ausführen, der entstehende Ton soll möglichst hoch sein (Mückenton). Der Strom soll nur während der Messung hindurchgehen. An das Induktorium wird ein Funkentöter geschaltet in der Anordnung der Abb. 29. Dieser besteht aus einem Kondensator von 0,5 Mikrofarad. Der Kondensator besteht aus zwei Aluminiumblechen, die in eine Sulfatlösung oder in Seifenwasser tauchen. Natürlich kann man auch einen der käuflichen Kondensatoren verwenden. Als Telephon dient ein gewöhnliches Bellsches Telephon (Haustelephon).

Das Aufsuchen des Tonminimums geschieht, indem man, das Telephon fest am Ohr, den Gleitkontakt um den Ort des Tonminimums hin- und herschiebt, die Exkursionen immer mehr

<sup>1)</sup> Statt dessen kann man einen ebensolchen Draht benutzen, der in 10 Windungen auf eine Walze aus isolierendem Material (Ton, Marmor, Hartgummi) aufgewickelt ist. An Stelle des Schleifkontaktes ist hier ein Kontakträdchen, das an einem vor dem Zylinder befindlichen, in 10 Teile geteilten Lineal die ganzen Umdrehungen ablesen läßt, während man die Bruchteile an einer Teilung auf dem Rande des Zylinders abliest.

einengt und so das Minimum auf möglichst weniger als 1 mm genau ermittelt. Die Güte des Tonminimums ist u. a. um so schärfer, je größer die Elektrodenfläche im Widerstandsgefäß, aber auch je größer der Widerstand (bis zu einer gewissen Grenze) in demselben ist. Zur Vergrößerung der Oberfläche der Elektroden werden diese mit Platinschwarz überzogen. Das Widerstandsgefäß hat für physiologische Zwecke am besten die nebenstehende Form (Abb. 28). Die Elektroden bestehen aus zwei starken, nicht biegsamen Platinblechen, die in starrer, unbeweglich fester Lage mittels starker kurzer Platindrähte an Glasröhren angeschmolzen sind. Die Platindrähte durchbohren das Glasrohr, innen werden sie mittels eines Quecksilberkontaktes und eingesteckter Kupferdrähte in den Stromkreis angeschlossen. Die Platinplatten werden zunächst mit konzentriertem  $H_2SO_4$  + Bichromat gereinigt, gewässert und dann platiniert. Dies geschieht, indem man in das Widerstandsgefäß die Platinierungsflüssigkeit nach Lummer (1 g Platinchlorid + 0,02 g Bleiacetat auf 100 Wasser) füllt und den Strom eines zweizelligen Akkumulators (4 Volt) unter zeitweiliger Wendung des Stromes 10 bis 15 Minuten hindurchschickt. Die Platinplatten müssen samtschwarz sein; bei Elektroden, die schon wiederholt platiniert worden sind, genügen zur Platinierung 1—2 Minuten. Dann werden die Elektroden mit Wasser gewaschen und die letzten hartnäckig haftenden Reste des Platinsalzes dadurch reduziert, daß man das Gefäß mit verdünnter  $H_2SO_4$  füllt und wieder unter wiederholter Wendung den Strom hindurchschickt. Zum Schluß werden die Elektroden mehrere Stunden in destilliertem Wasser gewaschen, welches häufig gewechselt wird. Über eine andere Form eines Widerstandsgefäßes siehe spez. Teil, S. 240.

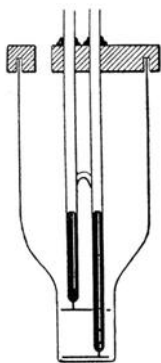


Abb. 28. Widerstandsgefäß.

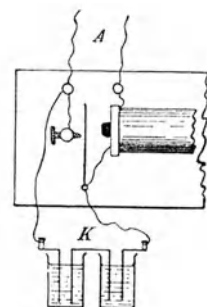


Abb. 29. Schaltung des Kondensators als Funkenzöter.  
(Aus Ostwald-Luther, 4. Aufl., S. 504).

Da die Leitfähigkeit stark von der Temperatur abhängig ist, muß das Leitfähigkeitsgefäß in einem Wasserbad mit genau regulierter Temperatur stehen.

Zuerst muß man das Widerstandsgefäß eichen. Zu diesem Zweck mißt man die Leitfähigkeit von sehr genau hergestellten

Zuerst muß man das Widerstandsgefäß eichen. Zu diesem Zweck mißt man die Leitfähigkeit von sehr genau hergestellten

KCl-Normallösungen. Das KCl (pro analysi Kahlbaum) wird vor dem Versuch eine Zeitlang schwach gegläht, bis kein Krepitieren der Krystalle mehr hörbar ist; nach dem Erkalten im Exsiccator werden zur Herstellung einer 0,1-n-Lösung 7,44 g analytisch abgewogen und in 1 Liter ausgekochtem und wieder abgekühltem Wasser oder besser in Leitfähigkeitswasser (in paraffinierten Glasballons von Kahlbaum; es muß vor der CO<sub>2</sub> der Luft durch ein Röhrchen mit Natronkalk geschützt werden) aufgelöst. Der Widerstand z. B. einer  $\frac{1}{10}$ - oder einer  $\frac{1}{50}$ -n-KCl-Lösung wird nun gemessen. Teilt die Stelle des Tonminimums den Meßdraht im Verhältnis  $a:b$  ( $a$  rechts), so ist der Widerstand  $w$  der KCl-Lösung, wenn  $R$  der eingeschaltete Widerstand des Rheostaten ist

$$w = R \frac{a}{b}$$

Für  $w$  (Widerstand der Lösung in dem betreffenden Widerstandsgefäß gemessen in Ohm) gilt im allgemeinen  $w = r \frac{l}{q}$ , wo  $l$  die Länge des Leiters in cm,  $q$  den Querschnitt desselben in cm<sup>2</sup>,  $r$  bei gegebener Temperatur eine von der Natur und Konzentration des Elektrolyten abhängige Konstante bedeutet, den sogenannten spezifischen Widerstand. Dessen reziproker Wert  $\frac{1}{r} = \kappa$  ist die spezifische Leitfähigkeit. Unter spezifischer Leitfähigkeit versteht man also den reziproken Widerstand bezogen auf Elektroden von 1 cm<sup>2</sup> Größe von 1 cm Abstand.

Die bekannte spezifische Leitfähigkeit der angewandten z. B.  $\frac{1}{50}$ n KCl-Lösung bei 25° beträgt 0,002765 reziproke Ohm (vgl. Tabelle). Es ergibt sich mit Hilfe der Gleichung  $\kappa = \frac{1}{w} \frac{l}{q}$

$$\frac{l}{q} = 0,002765 w = C.$$

$C$  ist die Widerstandskapazität des Gefäßes.

Mit diesem Faktor  $C$  (d. h. dem Verhältnis des Elektrodenabstandes zu dem wirksamen Querschnitt der Strombahn) müssen alle in diesem Gefäß vorgenommenen Messungen multipliziert werden, um die spezifische Leitfähigkeit der betreffenden Lösung zu finden. Man wiederholt die Bestimmung von  $C$  mehrere Male bei geänderter Temperatur und geänderter Normalität und nimmt für  $C$  aus diesen Bestimmungen das Mittel.

Ist  $\kappa$  die spezifische Leitfähigkeit einer Lösung, die in  $\varphi$  cm<sup>3</sup>

ein Mol des Elektrolyten gelöst enthält, so ist die molare Leitfähigkeit  $\Delta = \kappa \varphi$ . Bei der Berechnung der Äquivalentleitfähigkeit bedeutet  $\varphi$  diejenige Anzahl  $\text{cm}^3$ , in denen 1 Gramm-äquivalent gelöst ist.

Spezifische Leitfähigkeit von KCl-Lösungen bei verschiedenen Temperaturen:

$t^\circ$	$1/1\text{-n-KCl}$	$1/10\text{-n-KCl}$	$1/50\text{-n-KCl}$	$1/100\text{-n-KCl}$
15	0,09252	0,01048	0,002243	0,001147
18	0,09822	0,01119	0,002397	0,001225
21	0,10400	0,01191	0,002553	0,001305
25	0,11180	0,01288	0,002765	0,001413
27	0,11574	0,01337	0,002873	0,001468

Leitfähigkeitsmessungen zur Feststellung fermentativer Wirksamkeit kamen beim Trypsin (S. 238) und beim Erepsin zur Anwendung.

## Kinetische Messungen.

Die reaktionskinetischen Messungen dienen zur vergleichenden Untersuchung eines Reaktionsablaufs in Abhängigkeit von bestimmten Bedingungen. Man wählt die Bedingungen des Versuchs so, daß außer den zu messenden Einflüssen alle Faktoren konstant gehalten werden.

### Beziehungen zwischen Umsatz und Zeit.

Es seien folgende Möglichkeiten angeführt:

a) Der lineare Verlauf oder die Reaktion nullter Ordnung. Der Umsatz ist der Zeit direkt proportional. Die in jedem Augenblick verschwindende Substratmenge ist unabhängig von der jeweils noch vorhandenen Substratmenge; in gleichen Zeiten verschwinden gleiche Mengen Substrat

$$x = k \cdot t.$$

$x$  bedeutet die zur Zeit  $t$  verschwundene Substratmenge (oder auch die zur Zeit  $t$  gebildete Menge Spaltprodukte).  $k$  ist der Proportionalitätsfaktor, welcher von der Anfangsmenge des Substrates unabhängig ist.

b) Der monomolekulare Verlauf oder die Reaktion erster Ordnung. Die in jedem Augenblick verschwindende Substratmenge ist ein ganz bestimmter Bruchteil der jeweils noch

vorhandenen Substratmenge. Bezeichnet wieder  $a$  die im Anfang vorhandene Substratmenge,  $x$  die umgesetzte Substratmenge, so wird die in einem unendlich kleinen Zeitteile  $dt$  umgesetzte Substratmenge ausgedrückt durch die Differentialgleichung

$$\frac{dx}{dt} = k(a - x) \text{ integriert}$$

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x}$$

bzw.  $k' = 0,4243 k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x}.$

Viele Fermentreaktionen zeigen den monomolekularen Verlauf, wenigstens für bestimmte Bereiche der Spaltung.

Die Formel geht von der Voraussetzung aus, daß nur eine einzige Molekülart sich verwandelt, da z. B. das Wasser, das bei den meisten Fermentreaktionen mit in Reaktion tritt, im Vergleich zu dem gelösten Substrat im großen Überschuß vorhanden zu sein pflegt und deshalb seiner Konzentration nach als konstant angesehen werden kann.

c) Die bimolekulare Reaktion. Treten zwei Moleküle in Reaktion, und bezeichnet  $a$  und  $b$  die Anfangskonzentration dieser Molekülarten, und  $x$  die zur Zeit  $t$  umgewandelte Menge dieser Molekülarten, so sind die Geschwindigkeiten in jedem Augenblick proportional der Konzentration der beiden miteinander reagierenden Stoffe, also

$$\frac{dx}{dt} = k(a - x)(b - x)$$

oder, wenn bei äquimolekularen Mengen die beiden Konzentrationen als gleich gesetzt werden können,

$$\frac{dx}{dt} = k(a - x)^2.$$

Integriert lautet die Gleichung

$$k = \frac{1}{t} \frac{x}{a(a - x)}.$$

Beispiel für den linearen Verlauf<sup>1)</sup>.  
Spaltung des Äthylbutyrats durch Leberlipase.

<sup>1)</sup> Nach Knaffl-Lenz: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 97. S. 242. 1923.

Substrat 100 cm<sup>3</sup> 0,045-n-Äthylbutyrat, Ferment 0,6 cm<sup>3</sup> Leberlipase. Temp. 30°;  $p_h = 9,75$ .

$t$ (Min.)	$x = \text{cm}^3$ 0,5-n-NaOH	$x : t$
49	1,28	0,0261
73	1,95	0,0267
101	2,72	0,0269
131	3,58	0,0273
183	5,05	0,0276
268	7,65	0,0286
288	8,19	0,0281
326	8,86	0,0272
$\infty$	9,00	—

Beispiel für den monomolekularen Verlauf: Spaltung von Glycylglycin durch Erepsin<sup>1)</sup>: 0,1-n-Glycylglycin, 0,04-n-NaOH, 5 g Erepsinpräparat in 100 cm<sup>3</sup>, 37°.

Zeit (Min.)	$(a - x) 10^3$	$k 10^3 = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x}$
0	930	—
7	837	6,54
13	763	6,60
20	690	6,48
28	620	6,30
36	550	6,33

Sehr instruktiv ist die Berechnung von  $k$  nach der Formel der monomolekularen Reaktion bei der fermentativen Rohrzuckerspaltung durch Invertin nach Michaelis<sup>2)</sup>.  $k$  zeigt hier keinen konstanten Wert.

I	II	III	IV
Zeit in Minuten $t$	korrigierte Drehung	Drehungs- änderung $x$	$\frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x} = k$
0	[4,334]	0	—
0,5	4,234	0,010	—
21,0	3,945	0,389	0,00145
60,0	3,260	1,074	0,00151
130,0	2,129	2,205	0,00164
190,2	1,130	3,004	0,00171
246,0	0,744	3,590	0,00176

<sup>1)</sup> Euler: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 213. 1907. Bestimmungsmethode: Leitfähigkeitsänderung.

<sup>2)</sup> Michaelis, L.: Praktikum. S. 175ff.

$x$  bedeutet hier die abgelesene Drehungsänderung,  $a$  ist gleich der theoretisch zu erwartenden gesamten erreichbaren Drehungsänderung und läßt sich folgendermaßen berechnen. Ist  $+a$  die Anfangsdrehung,  $-b$  die Enddrehung, so ist  $b = 0,313 \cdot a$ . Die gesamte durchlaufene Drehung ist also  $(1 + 0,313) \cdot a$ , da die gesamte durchlaufene Drehung gleich der abgelesenen Anfangsdrehung  $+$  der abgelesenen Enddrehung ist.  $a$  ist hier 4,334, also die Gesamtdrehung = 4,334  $(1 + 0,313) = 5,690$ . Um einen Vergleich der gefundenen Werte  $a - x$  mit den theoretischen Werten zu bekommen, nimmt man das arithmetische Mittel aus den  $k$ -Werten;  $k_m = 0,001614$  und rechnet für ein solches  $k_m$  für jeden Wert von  $a$  den Wert  $(a - x)$  aus. Dazu nimmt man die Gleichung  $\log(a - x) = \log a - k_m t$ .

Es ergibt sich:

$t$	$a - x$ berechnet	$a - x$ beobachtet	Differenz zwischen Beobachtung und Berechnung
0	—	5,690	—
21,5	5,167	5,301	+ 0,134
60,0	4,489	4,616	+ 0,127
130,0	3,461	3,485	+ 0,024
190,2	2,766	2,686	— 0,080
246,0	2,248	2,100	— 0,148

Die Differenzen haben einen starken Gang und gehen über die zu erwartenden Fehlergrenzen hinaus. Die fermentative Rohrzuckerspaltung ist also nicht mit Hilfe der Formel der monomolekularen Reaktion erfaßbar.

Beispiel für den bimolekularen Verlauf: Spaltung des Serumalbumins durch Pepsin. Bei der angewandten Versuchsanordnung entspricht der Verlauf der peptischen Verdauung von Serumalbumin der bimolekularen Reaktionsformel<sup>1)</sup>.

10 cm<sup>3</sup> Substrat (Serumalbumin), 10 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$ -n-HCl, destilliertes Wasser zu 46,0 cm<sup>3</sup>, 4 cm<sup>3</sup> Pepsinlösung (1 : 29000),  $p_h = 2,38$ .

Spaltungszeit in Minuten	$x$	$a - x$	$\frac{x}{(a - x)} \frac{1}{a t} = k \cdot 10^3$
30	17,0	83,0	6,84
60	29,0	71,0	6,81
90	37,5	62,5	6,70
120	45,0	55,0	6,82
150	51,0	49,0	6,94
180	55,5	44,5	6,92

Die formale Behandlung fermentativer Spaltungsvorgänge mit Hilfe geeigneter Konstanten  $k$  wird sehr erleichtert, auch wenn

<sup>1)</sup> Rona u. Kleinmann: Biochem. Zeitschr. Bd. 159, S. 146. 1925.



diese nur selten geeignet sind, einen Einblick in das Wesen des Reaktionsablaufs zu gestatten.

### Beziehungen zwischen Umsatz und Temperatur.

Die Geschwindigkeit von Fermentreaktionen ändert sich einerseits infolge der Steigerung der Reaktionsfähigkeit des chemischen Systems mit steigender Temperatur, wobei sich eine Reihe von Faktoren superponieren, andererseits infolge der irreversiblen Schädigung des Enzyms bei steigendem Wärmegrad, infolge der Hitzeinaktivierung.

Zur Berechnung der Temperaturkonstanten ( $A$ ) dient eine Gleichung von Arrhenius:

$$A = \frac{\log k_2 - \log k_1}{0,4343} \cdot R \cdot \frac{T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1},$$

worin  $k_2$  und  $k_1$  die Reaktionskonstanten bei den absoluten Temperaturen  $T_2$  und  $T_1$  bedeuten,  $R$  ist die Gaskonstante, 0,4343 der Modulus der natürlichen Logarithmen. In einem bestimmten und kleinen Bereich gilt die Beziehung, daß ein Temperaturzuwachs von  $10^\circ$  die Geschwindigkeit verdoppelt bis verdreifacht.

Der Temperaturkoeffizient  $\frac{k_{t+10}}{k_t}$ , d. h. das Verhältnis der Reaktionskonstanten für zwei  $10^\circ$  auseinanderliegende Temperaturen beträgt oft 2—3. Diese Koeffizienten [nehmen bei steigender Temperatur in der Regel stark ab, während die Konstanten  $A$  in etwas größeren Temperaturbereichen ungeändert bleiben.

Vergleichbare Werte sind nur bei Konstanthaltung der übrigen Faktoren zu erwarten.

### Beziehungen zwischen Umsatz und Acidität.

(Aktivitäts- $p_h$ -Kurven.)

Die gestellte Aufgabe ist, quantitativ die Abhängigkeit des Umsatzes von der  $[H^+]$  oder was wohl dasselbe ist, diejenige Menge des angewandten Enzyms zu erfassen, die bei einer bestimmten  $[H^+]$  wirksam ist. Man vergleicht die Zeiten, die zur Erreichung eines bestimmten Umsatzes erforderlich sind. Diesen ist die wirksame Enzymmenge umgekehrt proportional. Man stellt also für eine beliebige  $[H^+]$  den Umsatz  $x$  als Funktion der Zeit  $T$  experimentell fest und betrachtet dies als Standardkurve. Um nun für eine andere  $[H^+]$  die relative Geschwindigkeit zu bestimmen, stellt man für mehrere Zeitpunkte  $t_1, t_2, t_3 \dots$  den dazugehörigen Umsatz  $x_1, x_2, x_3 \dots$  fest, und sucht auf der

Standardkurve diejenigen Zeiten  $T_1, T_2, T_3 \dots$  auf, die denselben Umsätzen  $x_1, x_2, x_3 \dots$  gleichfalls entsprechen.

Die Quotienten

$$\frac{T_1}{t}, \frac{T_2}{t_2}, \frac{T_3}{t_3} \dots,$$

die die relative Umsatzgeschwindigkeit bedeuten, dienen dann als Maß für die wirksame Fermentmenge, bezogen auf diejenige des Standardversuches.

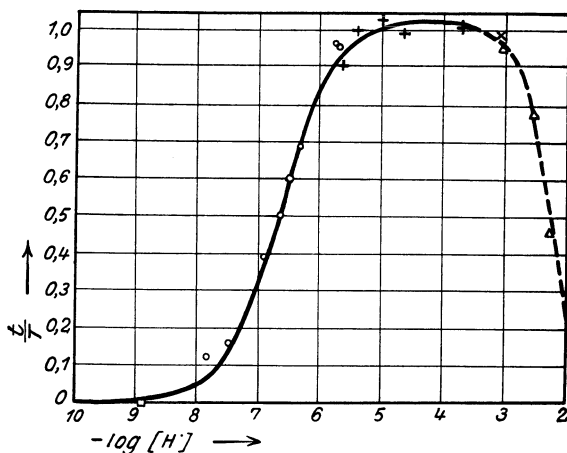


Abb. 30.

In der Abbildung 30, die den Einfluß der Wasserstoffionen auf das Invertin darstellt<sup>1)</sup>, wird die relative Umsatzgeschwindigkeit  $\frac{t}{T}$  auf der Ordinate, der negative Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration ( $p_h$ ) auf der Abszisse aufgetragen.

### Beziehungen zwischen Umsatz- und Substratmenge.

(Aktivitäts- $p_s$ -Kurven.)

Die Aufgabe ist, bei gegebener und optimaler  $[H']$  und Temperatur den Einfluß der Anfangskonzentration des Substrates auf die Spaltungsgeschwindigkeit zu untersuchen. Im folgenden wird am Beispiel der Saccharasewirkung auf Rohrzucker im wesentlichen der Arbeit von Michaelis und Menten<sup>2)</sup> gefolgt werden.

<sup>1)</sup> Michaelis u. Davidsohn: Biochem. Zeitschr. Bd.35, S. 386. 1911.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 333. 1913.

Um den hemmenden Einfluß der Spaltprodukte auszuschalten, ist nur die Anfangsgeschwindigkeit der Inversion experimentell zu untersuchen.

Die Versuchsanordnung ist folgende: Es wird eine wechselnde Menge einer bestimmten Saccharoselösung mit 20 cm<sup>3</sup> eines Ge-

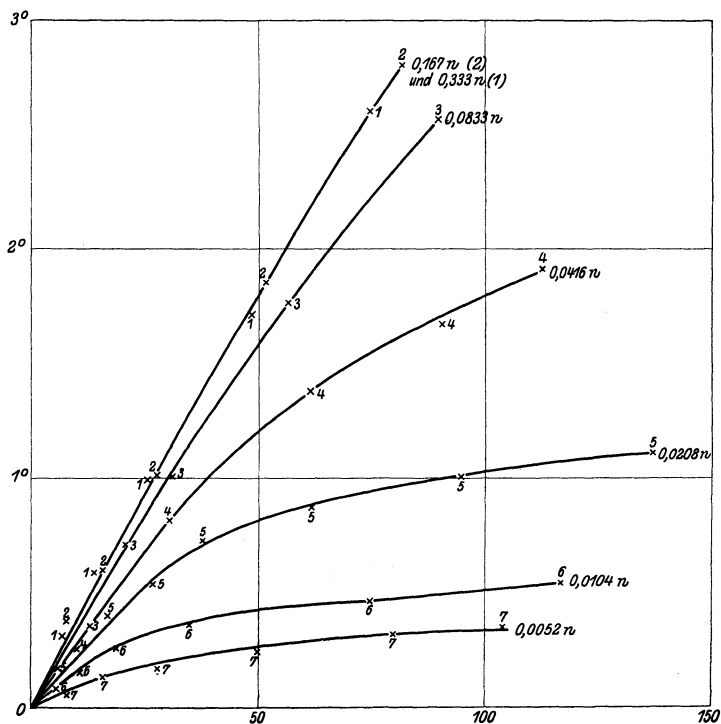


Abb. 31. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Abnahme der Drehung in Graden. Jede Kurve gilt für einen Versuch mit der angeschriebenen Anfangskonzentration von Saccharose. Fermentmenge überall gleich.

misches von gleichen Teilen einer  $\frac{1}{5}$ -n-Essigsäure und  $\frac{1}{5}$ -n-Natriumacetat und mit einer gewissen Fermentmenge und Wasser zur Auffüllung auf ein stets gleiches Volumen von 150 cm<sup>3</sup> versetzt. Alle Flüssigkeiten werden im Wasserbade auf  $25,0 \pm 0,05^\circ$  gehalten. Die erste Probe wird so schnell wie möglich nach dem Vermischen der Flüssigkeiten und dann weitere Proben in geeigneten Abständen entnommen. Jede entnommene Probe von 25 cm<sup>3</sup> wird zur Ausschaltung der Fermentwirkung und der Mutarotation in ein Gefäß mit 3 cm<sup>3</sup> einer  $\frac{1}{2}$  n-Sodalösung eingefüllt. Nach etwa

einer halben Stunde wird die Lösung polarimetrisch untersucht. Die Anfangsdrehung wird aus den ersten abgelesenen Werten extrapoliert. Als Anfangsgeschwindigkeit der Inversion wird die Drehungsabnahme pro Minute in dem ersten noch geradlinigen Intervall der ganzen Spaltungskurve bezeichnet.

Beispiel: Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Spaltung von der Rohrzuckermenge ergibt sich aus folgenden Überlegungen: Man nimmt an, daß das Invertin mit dem Rohrzucker eine Verbindung eingeht, die sehr labil ist und in freies Ferment, Glucose und Fructose zerfällt. Ferner wird angenommen, daß die Geschwindigkeit der Inversion proportional der jeweiligen Konzentration der Rohrzucker-Enzymverbindung ist. Für

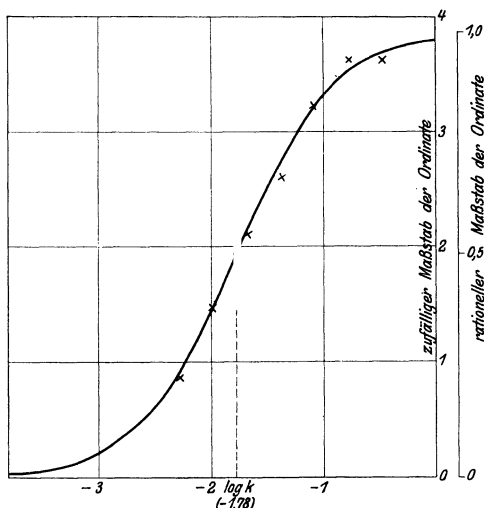


Abb. 32. Abszisse: Logarithmen der Anfangskonzentration der Saccharose. Ordinate: Die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung, ausgedrückt in Drehungsabnahme (in Graden), pro Zeiteinheit (Minute).

die Vereinigung von Ferment und Rohrzucker in stöchiometrischen Verhältnissen ergibt sich nach dem Massenwirkungsgesetz:

$$[S][\Phi - \varphi] = K\varphi,$$

woraus

$$\varphi = \Phi \frac{[S]}{[S] + K}.$$

Hier bedeutet [S] die Konzentration des freien Rohrzuckers oder, da ja vom Rohrzucker immer nur ein verschwindend kleiner Teil durch das Enzym gebunden ist, auch die Gesamtkonzentration des Rohrzuckers,  $\Phi$  die gesamte molare Fermentkonzentration,  $\varphi$  die Konzentration des gebundenen Ferments oder der Fermentzuckerbindung.  $[\Phi - \varphi]$  ist die Konzentration des freien Enzyms,  $K$  ist die Dissoziationskonstante der Ferment-Substratverbindung. Der Konzentration  $\varphi$  muß der Voraussetzung gemäß die Anfangsgeschwindigkeit der Inversion proportional sein, d. h.

$v = C \cdot \Phi \frac{[S]}{[S] + K}$ , wo  $C$  den [Proportionalitätsfaktor] bedeutet.

Da  $v$  experimentell in einem willkürlichen Maßsystem (Drehungsänderung pro Minute) gemessen wird und  $\Phi$  in einer Versuchsserie konstant gehalten wird, so kann man  $\frac{v}{C\Phi}$  einfach als  $V$  bezeichnen.  $V$  ist ein beliebiges Vielfaches von  $v$ , und der Anfangsdrehung proportional, also

$$V = \frac{[S]}{[S] + K}$$

Diese Funktion stimmt formal mit der Gleichung für den Dissoziationsrest einer Säure überein. Stellt man demgemäß  $V$  als eine Funktion von  $\log S$  dar, so muß sich eine Dissoziationsrestkurve ergeben.

Um dies zu prüfen, wird der  $\log S$  (der Anfangskonzentration des Rohrzuckers) auf der Abszisse aufgetragen. Unbekannt ist noch, welche Strecke als Einheit der Ordinate zu wählen ist. Zunächst ist nur bekannt, daß der größte Wert, den  $V$  asymptotisch erreicht, = 1 sein muß, und daß der Fußpunkt derjenigen Ordinate, welche den Wert  $1/2$  besitzt, den  $\log$  von  $K$  anzeigen muß (der Parameter der Dissoziationsrestkurve). Man kann nun zwei Wege einschlagen:

a) Hat man die Punkte um den Wendepunkt herum besser experimentell bestimmt, so trägt man die Punkte zunächst in ein willkürliches Ordinaten-system ein, wo die Einheit der Abszisse gleich der der Ordinate ist und wo auf der Abszisse der  $\log K$  aufgetragen ist. Man verbindet die Punkte durch eine gerade Linie. Der Neigungswinkel der Kurve gegen die Abszisse in dem Punkte, wo  $V = \frac{1}{2}$  ist, hat eine Tangente gleich 0,576 (d. h. einen Neigungswinkel von ziemlich genau  $30^\circ$ ). In dem willkürlichen Ordinaten-system findet man nun, daß die Tangente des Neigungswinkels in dem mittleren geradlinigen Teil gleich  $v$  ist. Daraus kann man schließen, daß die Einheit der Ordinate zur Einheit der Abszisse sich wie 0,576 :  $v$  verhalten muß, d. h. die Einheit der Ordinate ist das  $\frac{v}{0,576}$ -fache der Einheit der Abszisse. Nunmehr kann man an der Ordinate den richtigen Maßstab auftragen (vgl. Abbildung „rationeller Maßstab“).

b) Eine andere Methode der graphischen Bestimmung des Maßstabes der Ordinate ist folgende: Mehrere Punkte am rechten oberen Ende der Kurve sind experimentell besser bestimmbar.

Sie werden wieder in ein willkürliches Ordinatensystem, wie oben, eingetragen. Nun setzt man einfach den Maximalwert dieser Ordinate = 1. Man verbindet nun die im schrägen Ast der Kurve liegenden Punkte durch eine gerade Linie und mißt aus, welche Abszisse der Ordinate 0,5 entspricht.

Nunmehr kennt man  $K$  und kann graphisch die ganze Dissoziationskurve Punkt für Punkt bestimmen. Es müssen sich jetzt alle beobachteten Werte der Kurve gut einfügen, wenn es sich überhaupt um eine Dissoziationskurve handelt.

Solche Kurven, welche die Aktivität einer bestimmten Fermentmenge als Funktion des log der reziproken Substratkonzentration darstellen, nennt man in Analogie mit den oben besprochenen Aktivitäts- $p_h$ -Kurven, Aktivitäts- $p_s$ -Kurven. Ist der Scheitel der Aktivitäts- $p_s$ -Kurve aus experimentellen Gründen nicht hinreichend genau zu ermitteln, so kann man natürlich zur Bestimmung von  $K$  auch rechnerisch probieren, welcher Parameter mit der Neigung der Kurve am besten in Einklang steht.

Die der Ordinate 0,5 entsprechende Abszisse gibt  $-\log K$  an, man ist also in der Lage, die Dissoziationskonstante bzw. ihren reziproken Wert, die Affinitätskonstante der Ferment-Substratverbindung zu bestimmen.

## Enzymmaße und Einheiten<sup>1)</sup>.

Zur fortlaufenden Kontrolle bei der Reinigung von Fermenten ist es zweckmäßig, vergleichende Maße der Fermentwirkung zu besitzen. Die von Willstätter und Mitarbeitern eingeführten Maße und Einheiten sind Maße für die Mengen (Ausbeuten) an Ferment und Konzentrationen (Reinheitsgrade) der Fermente.

Die Ausbeuten sind in Enzymeinheiten ausgedrückt, die Konzentration der Enzyme durch Enzymwerte, die die Anzahl der Enzymeinheiten in einer gewissen Menge Substanz z. B. in 1 g, angeben.

Eine Enzymeinheit bewirkt unter den für die einzelnen Fermente verschiedenen, aber stets gleichen äußeren Bedingungen, die im speziellen Teil bei den einzelnen Fermenten genau beschrieben sind, in einer bestimmten Zeit einen bestimmten Umsatz des Substrates. Die für die Erzielung eines bestimmten Spaltungsgrades jeweils nötige Zeit entnimmt man aus empirischen Zeitumsatzkurven. Die Faktoren, welche die Fermentwirkung zu

<sup>1)</sup> Vgl. Oppenheimer-Kuhn: Die Fermente. S. 180.

beeinflussen imstande sind, werden konstant gehalten. Die Bestimmungen werden deshalb im  $p_h$ -Optimum vorgenommen, soweit im speziellen Teil nicht anderes angegeben. Die Temperatur wird konstant gehalten. Die Aktivierung durch Zusätze wird entweder maximal gestaltet (Trypsin-Enterokinase, Amylase-Kochsalz, Gärungsferment-Cozymase) oder es wird, wo die Zusätze in unübersichtlicherer Weise wirken (Lipasen), mittels ausgleichender Aktivierung und Hemmung nach Willstätter gearbeitet. Vgl. S. 100ff.

Über Enzymeinheiten vgl. im speziellen Teil für Lipase (S. 100, 102, 106), Saccharase (S. 132), Amylase (S. 175), Maltase (S. 136), Emulsin (S. 139), Lactase (S. 140), Trypsin (S. 257), Enterokinase (S. 264), Erepsin (S. 268), Arginase (S. 291).

In einzelnen Fällen kann die Reaktionskonstante (die z. B. dem Verlauf einer monomolekularen Reaktion entspricht) als Maß der Fermentmenge gelten.

Euler und Josephson<sup>1)</sup> schlagen die Bezeichnung der Enzymaktivität durch den Ausdruck

$$Xf = \frac{k \cdot g \text{ Substrat}}{g \text{ Enzympräparat}}$$

vor, wo  $k$  die unter festgelegten Bedingungen ermittelte Reaktionskonstante ist,  $Xf$  die „enzymatische Fähigkeit“ bezeichnen soll. Gilt die Beziehung, daß  $k$  von der Substratkonzentration unabhängig ist, so bestimmt Euler

$$Xf = \frac{k}{g \text{ Enzympräparat}}.$$

Zur Charakterisierung eines Enzyms ist die Angabe der enzymatischen Fähigkeit ( $Xf$ ) durch diejenige der Affinitätskonstante zu ergänzen<sup>2)</sup>:

$$K_M \text{ (Michaelis-Konstante)} = \frac{[\text{Enzym-Substrat}]}{[\text{Enzym}] \cdot [\text{Substrat}]}$$

## Beeinflussung von Fermentwirkungen durch Änderung der äußeren Bedingungen. Temperatureinfluß.

Wie bereits oben angedeutet wurde, sind die Fermentwirkungen in komplizierterer Weise von der Temperatur abhängig, indem die Reaktionsgeschwindigkeit einestells der allgemeinen chemischen Kinetik gehorcht und bei steigender Temperatur größer

<sup>1)</sup> Chem. Ber. Bd. 56, S. 1749. 1923.

<sup>2)</sup> Vgl. Euler: Chemie der Enzyme. S. 18.

wird; andernteils führt die Temperatursteigerung zu einer der ersten entgegengesetzten Wirkung, indem das Ferment irreversibel bei zunehmender Temperatur geschädigt wird. Das aus beiden Vorgängen resultierende Optimum liegt bei den meisten Fermenten zwischen 35—40°, doch ist das Optimum außerdem weitgehend abhängig von anderen Faktoren, dem  $p_h$ , der Gegenwart von Neutralsalzen und der Spaltprodukte.

Zur Konstanthaltung der Temperatur dienen Wasserbäder mit regulierbarer Heizung oder auch Warmluftbäder (Thermostaten)<sup>1)</sup>. Die Wasserbäder sind meistens große Bottiche aus Metall, manchmal mit Filz umkleidet, die zur gleichmäßigen Durchmischung mit einer mechanisch betriebenen Rührvorrichtung versehen werden. Die Beheizung geschieht mit Gas oder elektrischem Strom. Zur Konstanthaltung der Temperatur des Bades sind besondere Thermoregulatoren im Gebrauch. Der Gaszufluß wird dabei durch einen Quecksilberfaden reguliert, der je nach der Temperatur des Bades die Gaszufuhr mehr oder weniger freigibt. Bei den elektrisch regulierten und geheizten Bädern wird durch den steigenden oder fallenden Quecksilberfaden des Thermometers ein elektrischer Kontakt geschlossen oder geöffnet; durch diesen wird ein Elektromagnet betätigt, der den Gaszufluß abschließt oder öffnet.

### Die Wasserstoffionenkonzentration.

Von den Einflüssen des Milieus auf die Fermentwirkung ist bisher am eingehendsten ihre Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration untersucht worden. Zur vergleichenden Prüfung einer Fermentwirkung ist nicht nur die Messung der Wasserstoffionenkonzentration erforderlich, sondern auch ihre Konstanthaltung. Gemessen wird die Wasserstoffionenkonzentration in der Praxis entweder mittels Indicatoren oder elektrometrisch. Zur Konstanthaltung der Wasserstoffionenkonzentration dienen die sog. „Puffer“, die als automatische Regulatoren wirken.

Über die Nomenklatur mögen folgende Angaben orientieren: Die Konzentration der H-Ionen wird ausgedrückt in Gramm-Ion pro Liter. Das Symbol für Konzentration der H<sup>+</sup>-Ionen ist [H<sup>+</sup>] oder [H] oder  $h$  (Wasserstoffzahl). Das Symbol  $p_h$ , der Wasserstoffexponent, ist der negative Logarithmus der Konzentration,

$$\text{also } p_h = -\log h = \log \frac{1}{h}.$$

<sup>1)</sup> Vgl. Abschnitt Thermostaten in Ostwald-Luther: Physikochemische Messungen, 4. Aufl., S. 106.



Beispiel für die Umrechnung von  $h$  und  $p_h$ <sup>1)</sup>:

1. Es sei  $h = 2 \cdot 10^{-5}$ , dann ist  $\log h = \log 2 + \log 10^{-5}$

$$0,30 - 5 = -4,70$$

$$p_h = +4,70.$$

2. Es sei  $p_h = 6,70$ , dann ist

$$\log h = -6,70 = +0,30 - 7$$

$$h = 2,0 \cdot 10^{-7}.$$

Puffer oder Regulatoren sind Gemische von schwachen Säuren mit ihren Alkalisalzen (z. B. Essigsäure und Na-Acetat) oder auch Gemische von primären und sekundären sauren Salzen (z. B.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Ihr Wirkungsmechanismus ist derart, daß neu auftretende H- oder OH-Ionen im erheblichen Maße stets neutralisiert werden. Sie werden daher eine Änderung der Wasserstoffionenkonzentration stärker verhindern als nicht gepufferte Lösungen von gleicher Wasserstoffionenkonzentration. Durch Verdünnung mit Wasser wird ihre  $h$  zwar nicht wesentlich geändert (da die  $h$  nur von dem Verhältnis Säure:Salz abhängt, nicht aber von der absoluten Menge), aber ihr Pufferungsvermögen wird herabgesetzt.

Die gebräuchlichsten Puffermischungen sind von Sørensen und von Michaelis angegeben (vgl. Tabellen).

Tabelle von Michaelis für die am meisten verwendeten Pufferlösungen mit den (angenäherten) Werten für  $[\text{H}^+]$  und  $p_h$ .

	Chlorammon Ammoniak		prim. Phosphat sek. Phosphat		Essigsäure Essigsäures Na		Milchsäure Milchsäures Na		Weinsäure Weinsäures Na	
	[H]	$p_h$	[H]	$p_h$	[H]	$p_h$	[H]	$p_h$	[H]	$p_h$
$1/32$	$1 \cdot 10^{-11}$	11	$5 \cdot 10^{-9}$	8,3	$6 \cdot 10^{-7}$	6,22	$5 \cdot 10^{-6}$	5,3	$3 \cdot 10^{-5}$	4,5
$1/16$	$2 \cdot 10^{-11}$	10,7	$1 \cdot 10^{-8}$	8	$1,2 \cdot 10^{-6}$	5,9	$1 \cdot 10^{-5}$	5	$6 \cdot 10^{-5}$	4,2
$1/8$	$4 \cdot 10^{-11}$	10,4	$2 \cdot 10^{-8}$	7,7	$2,5 \cdot 10^{-6}$	5,6	$1,8 \cdot 10^{-5}$	4,7	$1,3 \cdot 10^{-4}$	3,8
$1/4$	$8 \cdot 10^{-11}$	10,1	$5 \cdot 10^{-8}$	7,3	$5 \cdot 10^{-6}$	5,3	$3,7 \cdot 10^{-5}$	4,45	$2,5 \cdot 10^{-4}$	3,6
$1/2$	$1,6 \cdot 10^{-10}$	9,8	$1 \cdot 10^{-7}$	7	$1 \cdot 10^{-5}$	5	$7,5 \cdot 10^{-5}$	4,17	$5 \cdot 10^{-4}$	3,3
$1/1$	$3,2 \cdot 10^{-10}$	9,5	$2 \cdot 10^{-7}$	6,7	$2 \cdot 10^{-5}$	4,7	$1,5 \cdot 10^{-4}$	3,8	$1 \cdot 10^{-3}$	3
$2/1$	$6,4 \cdot 10^{-10}$	9,19	$4 \cdot 10^{-7}$	6,4	$4 \cdot 10^{-5}$	4,4	$3 \cdot 10^{-4}$	3,5	$2 \cdot 10^{-3}$	2,7
$4/1$	$1,3 \cdot 10^{-9}$	8,89	$8 \cdot 10^{-7}$	6,1	$8 \cdot 10^{-5}$	4,1	$6 \cdot 10^{-4}$	3,2	$2,4 \cdot 10^{-3}$	2,4
$8/1$	$2,6 \cdot 10^{-9}$	8,58	$1,5 \cdot 10^{-6}$	5,8	$1,6 \cdot 10^{-4}$	3,8	$1,2 \cdot 10^{-3}$	2,9	$1 \cdot 10^{-2}$	2
$16/1$	$5 \cdot 10^{-9}$	8,3	$3 \cdot 10^{-6}$	5,5	$3,2 \cdot 10^{-4}$	3,3	$2,4 \cdot 10^{-3}$	2,61	$2 \cdot 10^{-2}$	1,7
$32/1$	$1 \cdot 10^{-8}$	8	$6 \cdot 10^{-6}$	5,2	$6,4 \cdot 10^{-4}$	3,19	$5 \cdot 10^{-3}$	2,3	$4 \cdot 10^{-2}$	1,4

<sup>1)</sup> Vgl. Michaelis: Praktikum S. 27.





## Boratmischung:

	$p_h$		$p_h$
10,00 cm <sup>3</sup> Borat. . . . .	9,241	10,00 cm <sup>3</sup> Borat . . . . .	9,241
9,50 „ „ + 0,50 cm <sup>3</sup> HCl	9,168	9,00 „ „ + 1 cm <sup>3</sup> NaOH	9,360
9,00 „ „ + 1,00 „ „	9,087	8,00 „ „ + 2 „ „	9,503
8,50 „ „ + 1,50 „ „	9,007	7,00 „ „ + 3 „ „	9,676
8,00 „ „ + 2,00 „ „	8,908	6,00 „ „ + 4 „ „	9,974
7,50 „ „ + 2,50 „ „	8,799	5,00 „ „ + 5 „ „	11,076
7,00 „ „ + 3,00 „ „	8,678	4,00 „ „ + 6 „ „	12,376
6,50 „ „ + 3,50 „ „	8,506		
6,00 „ „ + 4,00 „ „	8,289		
5,75 „ „ + 4,25 „ „	8,137		
5,50 „ „ + 4,50 „ „	7,939		
5,25 „ „ + 4,75 „ „	7,261		
5,00 „ „ + 5,00 „ „	6,548		
4,75 „ „ + 5,25 „ „	2,371		

$\frac{1}{10}$  mol Kaliumbiphthalat +  $\frac{1}{10}$  mol HCl (Clark und Lubs).

Zusammensetzung	$p_h$	Indicator
46,70 cm <sup>3</sup> HCl + 50 cm <sup>3</sup> Biphthalat bis 100 cm <sup>3</sup> .	2,2	} Tropäolin 00, Thy- molblau
39,60 „ „ + 50 „ „ „ 100 „ .	2,4	
32,95 „ „ + 50 „ „ „ 100 „ .	2,6	
26,42 „ „ + 50 „ „ „ 100 „ .	2,8	
20,32 „ „ + 50 „ „ „ 100 „ .	3,0	
14,70 „ „ + 50 „ „ „ 10 „ .	3,2	} Methyl- orange Brom- phenolblau
9,90 „ „ + 50 „ „ „ 100 „ .	3,4	
5,97 „ „ + 50 „ „ „ 100 „ .	3,6	
2,63 „ „ + 50 „ „ „ 100 „ .	3,8	

$\frac{1}{10}$  mol Kaliumbiphthalat +  $\frac{1}{10}$  mol NaOH (Clark und Lubs).

Zusammensetzung	$p_h$	Indicator
0,40 cm <sup>3</sup> NaOH + 50 cm <sup>3</sup> Biphthalat bis 100 cm <sup>3</sup>	4,0	} Methyl- org., Brphbl.
3,70 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	4,2	
7,50 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	4,4	
12,15 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	4,6	
17,70 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	4,8	} Methylrot Bromkresol- purpur
23,85 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	5,0	
29,95 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	5,2	
35,45 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	5,4	
39,85 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	5,6	
43,00 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	5,8	
45,45 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	6,0	
47,00 „ „ + 50 „ „ „ 100 „	6,2	

Kaliumbiphthalat wird hergestellt<sup>1)</sup>, indem man 60 g Ätzkali, das nur wenig Carbonat enthält, in 400 cm<sup>3</sup> Wasser auflöst und

<sup>1)</sup> Nach J. M. Kolthoff: Der Gebrauch von Farbindicatoren. 2. Aufl. S. 115. 1923.

50 g Orthophthalsäure oder doppelt sublimiertes Phthalsäureanhydrid zugibt. Die Lösung wird dann mit Phthalsäure oder Kalilauge auf ganz schwach alkalische Reaktion gegen Phenolphthalein eingestellt und dann nochmals die gleiche (hierauf zu achten!) Menge Phthalsäure zugegeben. Die aufgekochte Lösung wird heiß filtriert und das Kaliumbiphthalat unter häufigem Umschüteln beim Abkühlen durch Krystallisation gewonnen. Die abgenutzten Mengen werden wenigstens zweimal aus heißem Wasser umkrystallisiert, bei 110°—115° getrocknet: Die Krystallisation darf nicht unter 20° stattfinden, weil dann ein saures Salz auskrystallisiert.

Eine brauchbare Puffermischung ist die von Mc Ilvaine<sup>1)</sup> angegebene.

$p_h$	m/5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>2)</sup>	m/10 Citro- nensäure <sup>2)</sup>	$p_h$	m/5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>2)</sup>	m/10 Citro- nensäure <sup>1)</sup>
2,2	0,40	19,60	5,2	10,72	9,28
2,4	1,24	18,76	5,4	11,15	8,85
2,6	2,18	17,82	5,6	11,60	8,40
2,8	3,17	16,83	5,8	12,09	7,91
3,0	4,11	15,89	6,0	12,63	7,37
3,2	4,94	15,06	6,2	13,22	6,78
3,4	5,70	14,30	6,4	13,85	6,15
3,6	6,44	13,56	6,6	14,55	5,45
3,8	7,10	12,90	6,8	15,45	4,55
4,0	7,70	12,29	7,0	16,47	3,53
4,2	8,28	11,72	7,2	17,39	2,61
4,4	8,82	11,18	7,4	18,17	1,83
4,6	9,38	10,65	7,6	18,73	1,27
4,8	9,86	10,14	7,8	19,15	0,85
5,0	10,30	9,70	8,0	19,45	0,55

### Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration physiologischer Flüssigkeiten mittels Indicatoren.

Die Indicatorenmethode zur Bestimmung der [H<sup>+</sup>] einer Flüssigkeit beruht darauf, daß die Indicatoren ihre Farbennuance bei einer ganz bestimmten Wasserstoffionenkonzentration (bzw. in einem bestimmten engen Gebiet der Wasserstoffionenkonzentrationen) der Lösung ändern. Man kann daher aus der Farbe auf die [H<sup>+</sup>] der Lösung schließen. Haben zwei Lösungen dieselbe Farbe, so haben sie auch dieselbe Wasserstoffionenkonzentration.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 49, S. 183. 1921.

<sup>2)</sup> Das sekundäre Natriumphosphat wird dreimal umkrystallisiert, die 0,2 n-Stammlösung durch Titration gegen HCl mit Methylorange als Indikator eingestellt. Die Citronensäure wird mindestens zweimal umkrystallisiert, die 0,1 m-Lösung gegen kohlensäurefreie NaOH eingestellt.

Umschlagsintervalle einiger Indicatoren (Sörensen)<sup>1)</sup>.

Indicator	Intervall in $pH$	Indicator Menge in $cm^3$	Färbung		Bemerkungen
			Säure	Alkali	
Methylviolett . . . . .	0,1—3,2	3—8 Tr. 0,5 <sup>0/00</sup>	gelb	violett	über grün
Methylgrün . . . . .	0,3—2,0	1—4 „ 0,5 <sup>0/00</sup>	„	grünblau	scharfer Umschlag
Tropäolin 00 . . . . .	1,3—3,2	1—5 „ 1,0 <sup>0/00</sup>	rot	gelb	unschärf
Benzopurpurin . . . . .	1,3—5,0	1—3 „ 0,5 <sup>0/00</sup>	blauviolett	orange	
Dimethylgelb/Dimethylaminoazo- benzol . . . . .	2,9—4,0	5—10 „ 0,1 <sup>0/00</sup>	rot	gelb	scharf
Methylorange . . . . .	3,1—4,4	3—5 „ 0,1 <sup>0/00</sup>	„	orangegelb	„
Lacmoid . . . . .	4,4—6,6		„	blau	„
Methylrot . . . . .	4,2—6,3	2—4 „ 0,2 <sup>0/00</sup>	„	gelb	„
p-Nitrophenol . . . . .	5,0—7,0	3—20 „ 0,4 <sup>0/00</sup>	farblos	„	„
Neutralrot . . . . .	6,8—8,0	2—5 „ 0,1 <sup>0/00</sup>	rot	„	„
Azolithmin . . . . .	5,0—8,0	10—20 „ 0,5 <sup>0/00</sup>	„	blau	„ ziemlich scharf
Phenolphthalein . . . . .	8,2—10,0	3—20 „ 0,5 <sup>0/00</sup>	farblos	gelb	scharf
Thymolphthalein . . . . .	9,3—10,5	3—10 „ 0,4 <sup>0/00</sup>	„	blau	„
Alizaringelb . . . . .	10,1—11,1	5—10 „ 0,1 <sup>0/00</sup>	gelb	lila	„
Alizarinsulfosaures Natron, 2. Umschlag . . . . .	10,0—12,0	4—16 „ 0,1 <sup>0/00</sup>	braunrot	hellgelb	ziemlich scharf
Tropäolin 0 . . . . .	11,0—13,0	5—10 „ 0,1 <sup>0/00</sup>	gelb	orangebraun	ziemlich scharf

<sup>1)</sup> Vgl. Kolthoff, l. c. S. 42.

Man versetzt daher eine Reihe von Standardlösungen von bekannter  $H^+$ -Ionenkonzentration mit einem geeigneten Indicator, die zu messende Flüssigkeit mit demselben Indicator und vergleicht die Farben. Die übereinstimmende Farbe der zu prüfenden Lösung mit der eines Gliedes aus der Reihe der Standardlösung läßt die  $[H^+]$  der ersteren direkt erkennen.

Indicatoren von Clark und Lubs.

	$p_H$ -Gebiet	Farb- umschlag	Konzen- tration der alkoh. Lösung
Thymolblau . . . . .	1,2—2,8	rot-gelb	0,04 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>
Bromphenolblau . . . . .	3,0—4,8	gelb-blau	0,04 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>
Methylrot . . . . .	4,4—6,0	rot-gelb	0,02 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>
Bromkresolrot . . . . .	5,2—6,8	gelb-purpur	0,02 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>
Bromthymolblau . . . . .	6,0—7,6	gelb-blau	0,04 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>
Phenolrot . . . . .	6,8—8,4	gelb-rot	0,02 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>
Kresolrot . . . . .	7,2—8,8	gelb-rot	0,02 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>
Thymolblau . . . . .	8,0—9,6	gelb-blau	0,04 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>
Kresolphthalein . . . . .	8,2—9,8	farblos-rot	0,02 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>

Bei dieser Methode braucht man also Vergleichslösungen von bekannter  $[H^+]$ , wozu sich die Pufferlösungen am besten eignen. Bei einer von L. Michaelis angegebenen Indicatorenmethode braucht man die Vergleichslösungen mit bekannter  $[H^+]$  nicht. Sie beruht auf dem Prinzip, daß (bei einfarbigen Indicatoren) der Dissoziationsgrad und damit der Farbgrad des Indicators von der  $H^+$ -Konzentration der Lösung abhängt.

Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration mit Indicatoren nach L. Michaelis. Notwendige Reagenzien: A. 1.  $\beta$ -Dinitrophenol ( $OH:NO_2:NO_2 = 1:2:6$ ) 0,1 g zu 300 cm<sup>3</sup> Wasser. 2.  $\alpha$ -Dinitrophenol ( $OH:NO_2:NO_2 = 1:2:4$ ) 0,1 g in 200 cm<sup>3</sup> Wasser; 3.  $\gamma$ -Dinitrophenol (1:2:5), 0,1 g in 200 cm<sup>3</sup> Wasser; 4. *p*-Nitrophenol, 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>ige wässrige Lösung. 4. *m*-Nitrophenol 0,3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>ige wässrige Lösung. 5. Phenolphthalein, 0,04 g in 30 cm<sup>3</sup> Alkohol + 70 cm<sup>3</sup> Wasser. 6. *m*-Nitrobenzolzalicylsäure („Alizarin gelb GG“), gesättigte alkoholische Lösung etwa 10fach mit 50proz. Alkohol verdünnt. B. Einige Reagentgläser von gleichem Durchmesser. C. Eine durch Verdünnung von *n*-NaOH frisch bereitete Lauge von ungefähr 0,01 *n*-NaOH-Gehalt. (Bei Verwendung des Indicators Nr. 6 statt dessen von etwa 0,1 *n*-NaOH-Gehalt.) Ausführung der Bestimmung. In ein Reagentglas (Nr. I) werden 10 cm<sup>3</sup> der zu untersuchenden Lösung gebracht, dazu eine abgemessene Menge eines der

obigen Indicatoren, zwischen 0,25 und 1,0 cm<sup>3</sup>; es soll eine ganz schwache Färbung entstehen. Derjenige der obigen Indicatoren ist der geeignete, der bei diesen Mengenverhältnissen eine zwar deutliche, aber schwache Färbung erzeugt. — Jetzt wird in eine Reihe von Reagensgläsern zunächst je 9 cm<sup>3</sup> der Lauge gebracht und abnehmende Mengen des gleichen Indicators hinzugefügt, bis diejenige Indicatormenge gefunden ist, die die gleiche Farbtiefe in der Lauge erzeugt, wie sie in dem Reagensglas Nr. I herrscht. Indicator Mengen unter 0,25 cm<sup>3</sup> werden aus 10fach verdünnter Indicatorlösung entnommen; zum Schluß werden alle Röhren mit der Lauge auf das Volumen des Röhrens I aufgefüllt. Die Farbenvergleiche werden gegen weißen Untergrund, Blick seitlich durch die Reagensgläser oder von oben durch die ganze Länge derselben vorgenommen. Immer nur zwei Gläser gleichzeitig betrachten. Der Versuch ist beendet, wenn ein Röhren farbgleich mit Nr. I ist, ein zweites, das etwa 15% mehr Indicator enthält, deutlich zu dunkel, und ein drittes mit etwa 15% weniger Indicator deutlich zu hell erscheint. So wird (eventuell durch Interpolation) die Indicatormenge  $x$  ermittelt, die die Lauge ebenso stark färbt, wie die im Röhren I angewendete Indicatormenge  $a$ . Es ist  $\alpha = \frac{x}{a}$ , dann ist für Indicator Nr. 1 bis 4  $p_h = p_k + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$ . Die Werte für  $p_k$  findet man in Tabelle I, die für  $\log \frac{\alpha}{1-\alpha}$  in Tabelle II.

Tabelle I.

Temperatur	10°	20°	30°	40°	50°
$\beta$ -Dinitrophenol . . . . .	3,74	3,68	3,62	3,56	3,51
$\alpha$ -Dinitrophenol . . . . .	4,11	4,05	3,99	3,93	3,88
$\gamma$ -Dinitrophenol . . . . .	5,18	5,14	5,09	5,04	4,99
p-Nitrophenol . . . . .	7,27	7,16	7,04	6,93	6,81
m-Nitrophenol . . . . .	8,39	8,31	8,22	8,15	8,07

Tabelle II.

$\alpha$	$\log \frac{\alpha}{1-\alpha}$	$\alpha$	$\log \frac{\alpha}{1-\alpha}$	$\alpha$	$\log \frac{\alpha}{1-\alpha}$
0,005	— 2,30	0,05	— 1,28	0,3	— 0,37
0,007	— 2,15	0,06	— 1,20	0,4	— 0,18
0,008	— 2,07	0,07	— 1,12	0,5	+ 0
0,01	— 2,00	0,08	— 1,06	0,6	+ 0,20
0,015	— 1,81	0,09	— 1,00	0,7	+ 0,38
0,02	— 1,69	0,1	— 0,95	0,75	+ 0,49
0,03	— 1,51	0,15	— 0,75	0,8	+ 0,60
0,04	— 1,38	0,2	— 0,59	—	—



Für Indicator Nr. 5 (Phenolphthalein) gilt folgende Beziehung zwischen  $\alpha$  und  $p_h$  (für 18°):

$\bar{\alpha}$	$p_h$	$\alpha$	$p_h$	$\alpha$	$p_h$
0,01	8,45	0,21	9,20	0,55	9,80
0,03	8,60	0,27	9,30	0,60	9,90
0,069	8,80	0,34	9,40	0,65	10,00
0,090	8,90	0,40	9,50	0,70	10,10
0,12	9,00	0,45	9,60	0,75	20,20
0,16	9,10	0,50	9,70	0,80	10,3

Für Indicator Nr. 6 (Alizarin gelb GG) gilt folgende Beziehung zwischen  $\alpha$  und  $p_h$  (für 20°):

$\bar{\alpha}$	$p_h$	$\alpha$	$p_h$	$\alpha$	$p_h$
0,13	10,00	0,36	10,80	0,75	11,60
0,16	10,20	0,46	11,00	0,83	11,80
0,22	10,40	0,56	11,20	0,88	12,00
0,29	10,60	0,66	10,40	—	—

Anwendungsbereich der Indicatoren ( $p_h$ ):  $\beta$ -Dinitrophenol 2,2—4,0;  $\alpha$ -Dinitrophenol 2,8—4,7;  $\gamma$ -Dinitrophenol 4,0—5,6;  $p$ -Nitrophenol 5,2—7,0;  $m$ -Nitrophenol 6,7—8,4; Phenolphthalein 8,5—10,5; Alizarin gelb GG 10,2—11,7.

### Messung der Wasserstoffionenkonzentration mittels Gasketten.

Nach Nernst ist die elektromotorische Kraft ( $E$ ) einer Konzentrationskette

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{c_1}{c_2} \text{ bzw. } = \frac{RT}{F} 0,4343 \log \frac{c_1}{c_2},$$

wo  $c_1$  und  $c_2$  die Konzentration der stromerzeugenden Ionen bedeuten,  $R$  die Gaskonstante,  $T$  die Temperatur vom absoluten Nullpunkt gerechnet und  $F$  die Anzahl von Elektrizitätseinheiten (Coulombs) die 1 Mol eines einwertigen Ions trägt (96540). Die Konstante  $\frac{R}{F} \cdot 0,4343$  beträgt 0,0001983, wenn die  $E$  in Volt angegeben wird.

Um Wasserstoffionenkonzentrationen zu messen, belädt man Platinmetall mit Wasserstoff, wodurch es sich wie metallischer Wasserstoff verhält. Aus dem jeweiligen Potential einer Platin-Wasserstoff-Elektrode läßt sich die unbekannte  $[H^+]$  berechnen. Ein einzelnes Elektrodenpotential ist nicht meßbar, sondern nur ein Potentialunterschied zwischen zwei Elektroden. Als zweite

Elektrode wählt man wieder eine Wasserstoffelektrode, die in eine Lösung eintaucht, in der die  $H^+$ -Zahl genau definiert ist, am besten gerade gleich der Konzentration  $1\ n$  ist, d. h. im Liter  $1\ g\ H^+$ -Ionen enthält (entspricht einer  $1,25\ n\ HCl$ -Lösung), Diese Elektrode ist die sogenannte Normalwasserstoffelektrode. Wir haben

$$E = 0,0001983\ T \log \frac{c_0}{c}\ \text{Volt},$$

wo  $c$  die Wasserstoffionenkonzentration der unbekanntem Lösung,  $c_0$  die der Normalwasserstoffelektrode ist.  $c_0$  ist  $= 1$ ,

also 
$$E = 0,0001983 \cdot T \log \frac{1}{c}\ \text{Volt}$$

oder 
$$E = - 0,0001983\ T \log c\ \text{Volt}.$$

Soll also die Wasserstoffionenkonzentration  $c$  einer unbekanntem Lösung bestimmt werden, so wird man die Potentialdifferenz  $E$  zur Normalwasserstoffelektrode messen, und es ist dann  $E = - 0,0001983\ T \cdot \log \cdot c$  Volt, also:

$$\log c = - \frac{E}{0,0001983\ T}$$

und 
$$p_h = - \log c = \frac{E}{0,0001983\ T}.$$

An Stelle der  $n$ -Wasserstoffelektrode werden in der Praxis meistens andere Elektroden als Bezugs Elektroden benutzt. Da die Potentiale dieser anderen Elektroden gegenüber der  $n$ -Wasserstoffelektrode gut bekannt und konstant sind, läßt sich aus der Potentialdifferenz zwischen einer von diesen in der Praxis gebräuchlichen Elektroden  $\left(\frac{n}{10}\right)$  oder gesättigte Kalomelektroden) und der Wasserstoffelektrode mit der zu untersuchenden Lösung ebenfalls die Konzentration der  $H^+$  berechnen. Beträgt z. B. der Potentialunterschied einer Wasserstoffelektrode in einer Lösung mit unbekannter  $H^+$  gegenüber einer gesättigten Kalomelektrode  $a$  Millivolt, so beträgt er gegenüber der  $n$ -Wasserstoffelektrode  $a - 250,3$  Millivolt (bei  $18^\circ$ ). Bei den verschiedenen Temperaturen ist die Potentialdifferenz zwischen der  $n$ -Wasserstoffelektrode und den Bezugs Elektroden ebenfalls verschieden. Wie oben angegeben,

ist  $p_h = \frac{E}{0,0001983\ T}$ . Das Produkt  $T \cdot 0,0001983$  multipliziert mit 1000 zur Umrechnung von Volt in Millivolt ist  $\vartheta$ ;  $p_h$  ist somit  $= \frac{E}{\vartheta}$ . Mißt man gegen eine Kalomelektrode die Potential-

differenz  $E$ , so muß man von dem Werte  $E$  den jeweiligen Bezugswert zur n-Wasserstoffelektrode  $F$  abziehen und die Differenz durch  $\vartheta$  dividieren, also  $p_h = \frac{E-F}{\vartheta}$ . Die Werte für  $\vartheta = 0,0001983 T \cdot 10^3$

bei den verschiedenen Temperaturen lauten:

für 15° . . . . .	57,1
„ 16° . . . . .	57,3
„ 17° . . . . .	57,5
„ 18° . . . . .	57,7
„ 19° . . . . .	57,9
„ 20° . . . . .	58,1
„ 21° . . . . .	58,3
„ 22° . . . . .	58,5
„ 23° . . . . .	58,7
„ 24° . . . . .	58,9
„ 25° . . . . .	59,1
„ 26° . . . . .	59,3
„ 27° . . . . .	59,5
„ 28° . . . . .	59,7
„ 29° . . . . .	59,9
„ 30° . . . . .	60,07
„ 31° . . . . .	60,27
„ 32° . . . . .	60,47
„ 33° . . . . .	60,66
„ 34° . . . . .	60,86
„ 35° . . . . .	61,06
„ 36° . . . . .	61,25
„ 37° . . . . .	61,45
„ 38° . . . . .	61,64
„ 39° . . . . .	61,85
„ 40° . . . . .	62,05

Tabelle für  $F$  in Millivolt

	für die $\frac{1}{10}$ Kalomelektrode	für die gesättigte Kalomelektrode
bei 15° . . . . .		252,5
„ 16° . . . . .		251,7
„ 17° . . . . .		250,9
„ 18° . . . . .	337,7	250,3
„ 19° . . . . .		249,5
„ 20° . . . . .	337,5	248,8
„ 21° . . . . .		248,2
„ 22° . . . . .		247,5
„ 23° . . . . .		246,8
„ 24° . . . . .		246,3
„ 25° . . . . .		245,8
„ 30° . . . . .	336,4	
„ 37° . . . . .		235,5
„ 38° . . . . .	335,5	235,0
„ 40° . . . . .	334,9	
„ 50° . . . . .	332,6	
„ 60° . . . . .	329,0	

## Meßinstrumentarium.

Wie aus dem Obigen zu ersehen, läuft die Bestimmung der  $[H^+]$  auf die Messung eines Potentials hinaus und, da sich Einzelpotentiale nicht feststellen lassen, auf die Messung einer Differenz zwischen zwei Potentialen, einer sogenannten Potentialdifferenz.

Die weitaus gebräuchlichste und in der Praxis wohl allein benutzte Methode zur Messung von Potentialdifferenzen bedient sich des Poggendorfschen Prinzips der Kompensationsschaltung. Legt man eine Hilfsspannung, die von einer beliebigen Stromquelle, z. B. einem Akkumulator herrührt, an die beiden Enden eines Meßdrahtes an, so erhält man einen Stromkreis, den sog. „großen Stromkreis“ (Abb. 33). Legt man die zu untersuchende Spannung mit einem Pol an das eine Ende des Meßdrahtes, mit dem anderen Pol an einen verschiebbaren Kontakt, der so eingerichtet ist, daß man ihn mit jedem Punkt des

Meßdrahtes verbinden kann, so erhält man einen zweiten Stromkreis, den sog. „kleinen Stromkreis“. Achtet man nun bei der Schaltung darauf, daß die

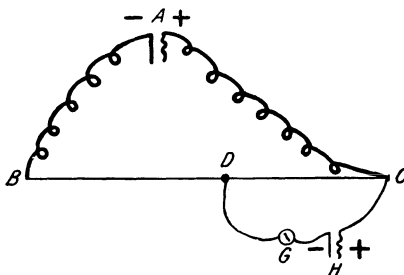


Abb. 33.

Spannungen einander entgegengeschaltet sind, also z. B. daß der positive Pol der Hilfsspannung und der positive Pol der zu untersuchenden Spannung an dem einen Ende des Meßdrahtes zusammentreffen, so tritt unter bestimmten Bedingungen in dem kleinen oder Teilstromkreis Stromlosigkeit ein, nämlich dann, wenn auf der den beiden Stromkreisen gemeinsamen Strecke des Meßdrahtes von der Hilfsspannung und der zu untersuchenden Spannung dasselbe Potential abfällt. Die Stromlosigkeit wird durch ein Nullinstrument festgestellt, das in den kleinen Stromkreis eingeschaltet ist. Die unbekannte Spannung läßt sich nun leicht berechnen. Sie ist gleich dem Spannungsabfall der Hilfsspannung auf dem nach erfolgter Kompensation gemeinsamen Meßdrahtstück beider Stromkreise. Der Meßdraht ist gleichmäßig unterteilt und an allen Stellen von genau gleichem Widerstand. So ist es möglich, aus dem Meßdrahtstreckenverhältnis den Teil der Hilfsspannung sofort in Form eines Bruches abzulesen, der der zu untersuchenden Spannung gleich ist. Es verhalten sich also die Spannungen

in dem speziellen Fall der Stromlosigkeit wie die Widerstände und auch wie die entsprechenden Strecken,

$$E_{DC}:E_{BC} = \text{gemeinsames Meßdrahtstück} : \text{ganzer Meßdraht.}$$

Kennt man die elektromotorische Kraft der Hilfsspannung ganz genau, so kennt man hiernach auch die unbekannte Spannung. Die Meßdrahtapparatur kommt noch heute zur Messung von Potentialdifferenzen sehr viel zur Anwendung. Nach dem Vorschlag von Wilh. Ostwald wurde aber eine Abänderung vorgenommen. Da der Widerstand des Meßdrahtes nur sehr gering ist, so wird von der Hilfsbatterie auch ein ziemlich erheblicher Strom während der Messung entnommen. Zur Vermeidung des hohen Stromverbrauchs, der zur Inkonstanz der Hilfsspannung führen kann, muß man den Widerstand um ein Vielfaches erhöhen. Da der Verlängerung des Meßdrahtes als horizontale Meßbrücke oder auch als Walzenbrücke Grenzen gesetzt sind, führte Ostwald die sogenannten Rheostatenkästen ein. Hier sind die zwischengeschalteten Drahtlängen, also auch die Widerstände viel größer, und trotzdem ist die ganze Brücke der Ausdehnung nach viel kleiner, da die Drähte auf Spulen aufgewickelt sind. In der Anordnung nach L. Michaelis werden solche Stöpselrheostatenkästen benutzt. Die Vergrößerung und Verringerung des Widerstandes im Teilstromkreis geschieht dann nicht mehr durch Verschieben des Gleitwiderstandes, wie auf dem Draht, sondern durch Herausnehmen oder Hereinstecken der Stöpsel. Bei der Michaelisschen Anordnung werden zur weiteren Vereinfachung der Bedienung zwei Rheostatenkästen benutzt.

Aus der oben angeführten Gleichung wird  $E_x$  (die unbekannte Potentialdifferenz) durch Multiplikation von  $E_A$  (die EMK des Akkumulators) mit einem Quotienten berechnet. Will man  $E_x$  genau haben, so muß man auch  $E_A$  genau kennen. Es ist also vor Beginn einer jeden Messung zunächst einmal  $E_A$  genau festzustellen (Eichung der Akkumulatoren). Dazu bedient man sich desselben Poggendorfschen Prinzips unter Benutzung einer gut reproduzierbaren praktisch konstanten Potentialdifferenz eines sogenannten Normalelementes, z. B. des Normalelements (Cadmiumnormalelement) mit einer Potentialdifferenz von 1018,6 (bei Zimmertemperatur innerhalb aller in Betracht kommenden Temperaturschwankungen). Zur Feststellung der Hilfsspannung schaltet man in den Teilstromkreis an Stelle der zu untersuchenden Spannung dieses Normalelement ein und sucht nun die Nullstellung auf der Brücke durch Verschieben des Gleitwiderstandes, bzw. durch geeignete Stöpselung an den Rheostaten herzustellen.

Ist das erfolgt, so läßt sich mit Hilfe obiger Proportion die Spannung des Akkumulators errechnen. In diesem Falle ist  $E_{1018,6} : E_A =$  die Länge des gemeinsamen Stücks der Meßbrücke zur ganzen Länge, also  $E_A = \frac{1018,6 BC}{DC}$ . Setzt man in die obige Gleichung

diesen Wert für  $E_A$  ein, so hat man  $E_x$ , die Spannung der zu untersuchenden Kette bestimmt. Der Messung am Meßdraht muß also zuerst eine Feststellung der Akkumulator- (oder allgemeiner Hilfs-) Spannung vorhergehen.

Durch eine bestimmte Anordnung lassen sich noch rechnerische Vereinfachungen erzielen. Wenn die Hilfsspannung, die an den beiden Polen der Brücke oder des Rheostatenkastens liegt, gerade so groß gewählt wird, daß die Summe der Brückenunterteilung zahlenmäßig gleich der angelegten Spannung ist, so entspricht ein Spannungsteil einem Brückenteil. Liegt also z. B. an einem Meßdraht von 1000 mm Länge eine Spannung von 1000 Millivolt, so entspricht 1 mm gerade einem Millivolt Spannungsabfall, oder liegt eine Spannung von 1110 Millivolt an einem Rheostatenkasten von 1110  $\Omega$  Widerstand, so entspricht 1  $\Omega$  dieses Rheostatenkastens ebenfalls einem Millivolt. Es fällt dann jegliche Umrechnung fort. Um nun diese erwünschte Spannung an die Enden der Brücke anlegen zu können, wird ein sogenannter Vorschaltwiderstand benutzt. Das gesamte Meßinstrumentarium nach Michaelis besteht somit aus zwei Rheostatenkästen, einem Vorschaltwiderstand, einer Hilfsbatterie, einem Cd-Normalelement, den notwendigen Stromschlüsseln und Drähten und einem Nullinstrument. Als Nullinstrument dient noch häufig, auch bei der Michaelisschen Apparatur, ein sogenannter Capillarelektrometer. Ein Quecksilberfaden, dessen Meniscus durch ein kleines Fernrohr beobachtet wird, steigt oder sinkt je nach der Richtung des hindurchtretenden Stromes. Bewegt sich dieser Faden nicht mehr, so besteht Stromlosigkeit. Ebenfalls kann natürlich als Nullinstrument ein hochempfindliches Galvanoskop benutzt werden.

Beschreibung der Messung einer Potentialdifferenz in der Michaelisschen Anordnung (Abb. 35): Man stellt die beiden Rheostatenkästen nebeneinander auf und verbindet das Ende des linken (rechte Klemme) mit dem Anfang des rechten (linke Klemme) durch einen Kupferdraht, verbindet dann die linke Klemmschraube des linken Rheostaten mit dem negativen Pol des Akkumulators, die rechte Klemmschraube des rechten Rheostaten mit dem positiven Pol des Akkumulators. In das Drahtstück vom linken Pol des linken Rheostaten zum negativen Pol des Akkumulators schaltet man den Vorschaltwiderstand

und einen Stromschlüssel ein. Hiermit ist der große Stromkreis hergestellt.

Der Teilstromkreis beginnt am rechten Pol des rechten Rheostaten, führt zum positiven Pol der zu untersuchenden Spannung (anfänglich also des Normalelements, später zur gesättigten Kalomelektrode) vom negativen Pol dieser Spannung über einen Stromschlüssel zu einer Klemme des Capillarelektrometerstativs, von der anderen Klemme des Capillarelektrometerstativs zur linken Klemme des rechten Rheostaten. Sind diese Verbindungen sämtlich hergestellt und auf ihre Kontaktsicherheit geprüft, so verbindet man die beiden Pole des Ca-

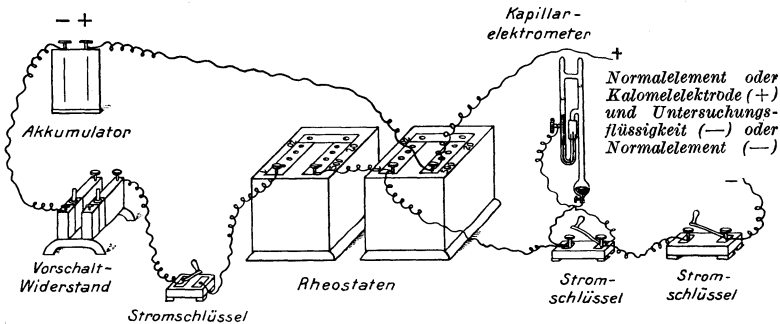


Abb. 34.

pillarelektrometers durch dünne spiralige Drähte mit den Polen seines Stativs und stellt den Meniscus des Quecksilberfadens mit dem Fernrohr in die Mitte der Fernrohrskala. Das Stativ ist so angeordnet, daß man durch Drehen der verschiedenen horizontal und vertikal wirkenden Schrauben die Einstellung leicht ausführen kann. Vor dem Messungsbeginn überzeugt man sich noch einmal davon, daß das Elektrometer nicht polarisiert ist und daß auch keine Isolierungsfehler bestehen. Die Polarisation des Capillarelektrometers erkennt man daran, daß es Ausschläge zeigt, ohne daß man Strom hindurchschickt. In diesem Falle muß ein neuer Meniscus hergestellt werden<sup>1)</sup>. Die hauptsächlichsten Isolierungsfehler vermeidet man dadurch, daß man das

<sup>1)</sup> Herstellung des Meniscus: Das Elektrometer wird schräg gehalten, so daß der größte Teil des Quecksilbers aus dem zur Kugel ausgeblasenen Teil durch das obere Querstück in den zylindrischen Schenkel überläuft. Nun wird das Elektrometer nur ganz leicht nach der entgegengesetzten Seite geneigt, wobei soviel Quecksilber wieder durch die Capillare in den kugeligen Teil zurücktropft, daß der Meniscus sich beim Aufrichten des Elektrometers ungefähr in die Mitte der Capillare einstellt.

Capillarelektrometerstativ, den Vorschaltwiderstand und auch die Stromschlüssel auf paraffinierte Glasplatten stellt.

Man beginnt die Messung, indem man aus dem linken Rheostatenkasten sämtliche Stöpsel herausnimmt, dann steckt man von dem rechten Rheostatenkasten soviel Stöpsel in die entsprechenden Löcher des linken hinüber, daß im rechten Rheostatenkasten (also im kleinen Stromkreis) nunmehr  $1018 \Omega$  liegen, während die Ohmzahl im großen Stromkreis unverändert geblieben ist. Jetzt reguliert man den Vorschaltwiderstand so lange, bis das Nullinstrument keinen Ausschlag mehr zeigt. Um das Capillarelektrometer zu bedienen, faßt man mit der rechten Hand an den Stromschlüssel des kleinen Stromkreises, mit der linken an den Stativschlüssel. Während man nun durch das Fernrohr den Meniscus beobachtet, schließt man mit der rechten Hand den Stromschlüssel des Teilstromkreises und öffnet den Stativschlüssel gerade nur so viel und so lange, daß man die Richtung des Ausschlags des Quecksilberfadens erkennt. Diese Vorsicht ist dringend zu beachten, da sonst zu häufig das Capillarelektrometer polarisiert wird. Man verstellt den Vorschaltwiderstand so lange, bis auch bei längerem Öffnen des Stativschlüssels der Hg-Faden unbeweglich steht. Glaubt man diesen Punkt erreicht zu haben, so überzeugt man sich davon, daß die Ruhe im Capillarelektrometer nicht die Folge eines inzwischen eingetretenen Kontaktfehlers ist, indem man ein Ohm vom linken Rheostatenkasten in den rechten zurückstöpselt. Dann muß der Faden durch das Fernrohr betrachtet nach unten gehen. Stöpselt man andererseits noch ein  $\Omega$  vom rechten Rheostatenkasten in den linken, so daß der Widerstand des rechten Rheostatenkasten  $1019 \Omega$  beträgt, so muß der Hg-Faden nach oben steigen. So läßt sich auch sehr leicht die Empfindlichkeit des Capillarelektrometers prüfen. Es ist nur dann geeignet, wenn es bei einer Differenz von  $1 \Omega$  mindestens einen Skalenstrich des Fernrohrs nach unten bzw. nach oben ausschlägt. Bei dieser Anordnung entspricht  $1 \Omega$ , wie oben gesagt, 1 Millivolt, und es lassen sich mit einem guten Capillarelektrometer daher Spannungsmengen unter 1 Millivolt durch Berücksichtigung der Ausschläge des Hg-Fadens innerhalb der Skala abschätzen. Nunmehr ist der Apparat zur Messung der unbekanntes Kette gebrauchsfertig und an Stelle des Normallements wird die unbekanntes Kette in den Teilstromkreis eingeschaltet. Die Anordnung der Pole bei der unbekanntes Kette ist je nach der Wahl der Elektrode verschieden. Will man prüfen, ob man die Pole richtig geschaltet hat, so nimmt man aus dem Teilstromkreis den gesamten Widerstand heraus (Einsetzen aller



Stöpsel in den rechten Rheostatenkasten) und prüft nun ganz vorsichtig den Ausschlag des Capillarelektrometers beim Schließen des Teilstromschlüssels und ganz kurzen Öffnen des Stativschlüssels. Sieht man den Ausschlag nach unten gehen, so ist die unbekannte Kette richtig geschaltet, geht er nach oben, so müssen die Pole umgeschaltet werden. Es wird noch ausdrücklich darauf

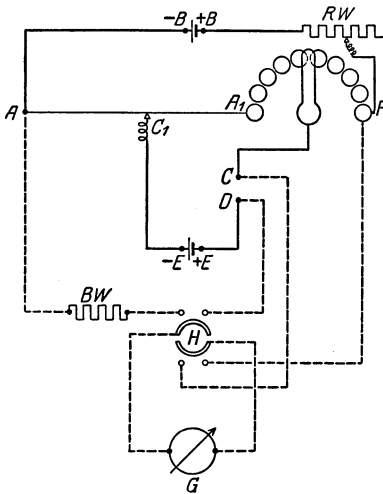


Abb. 35. Leitungsschema.  
*B* Akkumulator, *RW* Regulierwiderstand,  
*A*—*A*<sub>1</sub> Meßdraht, *A*<sub>1</sub>—*F* Drehrheostat,  
*C*<sub>1</sub> Gleitkontakt, *E* unbekannte Spannung,  
*BW* Ballastwiderstand, *H* Umschalter,  
*G* Galvanometer.

hingewiesen, daß der Schlüssel am Capillarelektrometerstativ nur zu der Messung kurz geöffnet wird, sonst immer geschlossen bleiben muß.

Potentiometer. An Stelle der Apparatur nach L. Michaelis kann auch ein Potentiometer zur Messung von Potentialdifferenzen dienen. Es soll die Messung mit einem Potentiometer nach E. Mislowitzer<sup>1)</sup> beschrieben werden (Abb. 35). Die Apparatur besteht aus dem Kompensationskasten und dem dazugehörigen Meßinstrument. Man stellt das Meßinstrument vorsich hin, den Kompensationskasten rechts neben das Meßinstrument und öffnet den Deckel des Kastens. Das Meßinstrument ist ein hochempfindliches Fadengalvanometer, das vor Entarretierung des Zeigers genauestens durch Bewegen der drei Stellschrauben horizontal eingestellt werden muß. Eine Lupe dient dazu, die Libelleneinstellung zu kontrollieren. Ist das geschehen, so verbindet man die beiden Klemmen des Meßinstrumentes durch Leitungsschnüre mit den durch „G“ bezeichneten Steckkontakten am Kompensationskasten (und zwar positiv mit +, negativ mit —). Ferner verbindet man die Pole eines 2-Voltakkumulators mit den mit V bezeichneten Steckkontakten am Kompensationskasten (ebenfalls + mit +, — mit —). Den sogenannten Voltmeterumschalter (s. Abb. 36) stellt man von *M* auf *P* und reguliert dann den Vorschaltwiderstand *RW* in seinem groben und feinen Anteil so lange, bis der Zeiger des Meßinstrumentes sich ganz genau über

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 159, S. 68. 1925.

dem roten Strich 1100 befindet (Lupeneinstellung). Dann schaltet man den Voltmeterumschalter von  $P$  auf  $M$  zurück, und die eigentliche Messung kann beginnen. Sollte sich der Nullpunkt des Fadengalvanometers eine Kleinigkeit verändert haben, so läßt sich das durch die angebrachte Nullpunktskorrektions-schraube verändern, wenn man es nicht vorzieht, die Differenz bei der Einstellung auf den 1100-Strich zu berücksichtigen. Die Einstellung der Hilfsspannung auf 1100 Millivolt kann mit einem kleinen Fehler behaftet sein, der in  $p_h$  ausgedrückt 0,1 wohl kaum überschreiten dürfte, häufig aber weit darunter liegt. Will man vollkommen genaue Meßresultate erhalten, so schaltet man an die Steckkontakte  $E$  des Kompensationskastens ein Normalelement von 1018 Millivolt (+ mit +, - mit -) und reguliert nun den Vorschaltwiderstand so lange, bis der Zeiger beim Betätigen des

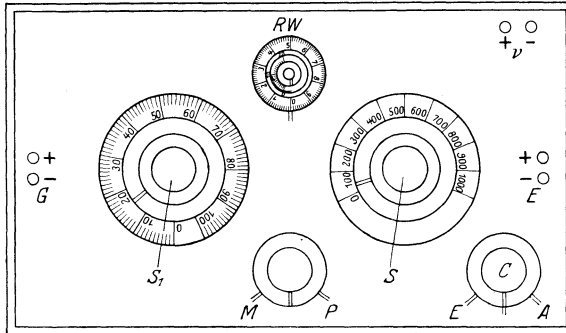


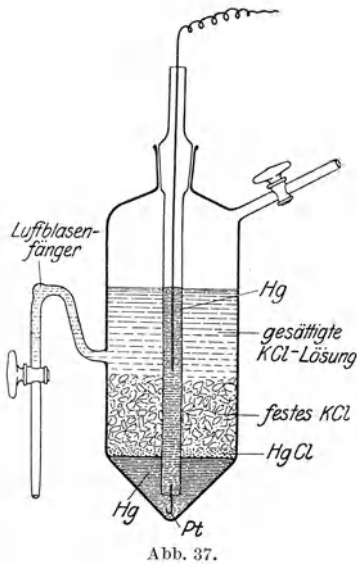
Abb. 36.  $G$  Galvanometer,  $V$  Akkumulator,  $E$  Untersuchungsspannung,  $C$  Schalter ( $A$  aus,  $E$  ein),  $RW$  Regulierwiderstand,  $S$  und  $S_1$  Skalendrehknöpfe ( $S$  grob,  $S_1$  fein),  $MP$  Voltmeter, umschaltbar (bei  $M$  ist das Galvanometer Nullinstrument, bei  $P$  ist es Voltmeter).

Aus- und Einschalters  $C$  weder nach links, noch nach rechts ausschlägt. Der Voltmeterumschalter muß bei dieser Art von Einstellung, mit der man die höchsten Grade der Genauigkeit erzielt, auf  $M$  stehen und die Skalendrehknöpfe auf 1018 ( $S = 1000$ ,  $S_1 = 18$ ). Will man nun die zu untersuchende Kette messen, so verbindet man ihre Pole mit den Steckkontakten bei  $E$ , stellt die beiden Skalendrehknöpfe  $S$  und  $S_1$  auf 0 und dreht den Schalter  $C$  vorsichtig in Richtung  $E$ , schaltet aber nur dann ganz bis  $E$ , wenn in einer Zwischenstellung zwischen  $A$  und  $E$  der Zeiger noch keinen Ausschlag gibt. Der Zeiger muß nach links ausschlagen, wenn die Pole der unbekanntten Kette richtig liegen. Gegebenenfalls wird umgepolt. Nunmehr stellt man den rechten Skalendrehknopf  $S$  auf 100, schaltet den Knopf  $C$  wieder vorsichtig ein und sieht nach, ob der Zeiger noch nach links ausschlägt.

Ist das der Fall, so dreht man den Knopf *S* auf 200, dann auf 300 usw., bis der Zeiger nach rechts ausschlägt. Ist das z. B. bei 500 zu beobachten, so schaltet man auf 400 zurück und sucht nun durch Drehen des linken Skalenknopfes den Punkt, wo der Zeiger nicht mehr ausschlägt. Die feinsten Unterschiede lassen sich noch mit der Lupe erkennen. Steht er z. B. bei 45 vollkommen still, so hat die zu untersuchende Kette eine Spannung von  $400 + 45$ , also gleich 445 Millivolt.

### Die Elektroden.

Die Kette, deren Potentialdifferenz man messen soll, besteht aus der Bezugs elektrode und der Ableitungselektrode. Die Bezugs elektrode hat einen festen gegebenen Wert gegenüber der Normalwasserstoffelektrode, d. h. gegen eine mit Wasserstoff



von normalem Druck beschickte Platinelektrode, die in eine in bezug auf die H I n-Lösung eintaucht. Als Bezugs elektroden dienen am häufigsten 0,1-n-Kalomelektroden oder gesättigte Kalomelektroden. Die Kalomelektroden stellt man selbst her. Man benutzt entweder gewöhnliche Flaschen von ca. 100 cm<sup>3</sup> Inhalt oder die käuflichen Elektrodengefäße.

Herstellung einer 0,1-n-Kalomelektrode<sup>1)</sup>: Der Boden des Gefäßes (am besten die Form, wie sie Abb. 37 zeigt) wird mit einer Schicht reinen Quecksilbers gefüllt, so weit, daß der Platinkontakt gut untertaucht.

Reines Quecksilber stellt man sich in der Weise her, daß man 20 cm<sup>3</sup> käufliches, reines, destilliertes Quecksilber mit demselben Volumen einer etwa 1 proz. Lösung von Mercuronitrat und einigen Tropfen Salpetersäure etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde lang heftig schüttelt. Dann wird die Lösung vom Quecksilber abgegossen, das Quecksilber gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und wiederholt wie oben geschüttelt. Dann wird es in eine Porzellanschale

<sup>1)</sup> Vgl. Michaelis: Praktikum, S. 149.

gegossen, das Wasser abgegossen und der Rest des Wassers mit Filtrierpapier entfernt.

Den Platinkontakt amalgamiert man vorher; er wird dazu in konzentrierter Schwefelsäure gereinigt und gewaschen, dann als Kathode in ein Gefäß mit einer Lösung von 1% Mercuronitrat mit einigen Tropfen  $\text{HNO}_3$  gesteckt, während als Anode ein kleiner Platindraht dient. Nun wird der Strom eines einzelligen Akkumulators ganz kurze Zeit hindurchgeschickt, bis das Platin von einer grauen Schicht Hg bedeckt erscheint. Dann wird mit Wasser abgewaschen und durch Absaugen mit Fließpapier vorsichtig getrocknet. Der Platinkontakt wird jetzt in das Elektrodengefäß eingesetzt, der Glasschliff leicht gefettet.

Ferner wäscht man eine kleine Menge reinen Kalomels in einer Schale mit 30 cm<sup>3</sup> der 0,1-n-KCl-Lösung einige Minuten unter Umrühren mit einem Glasstab, läßt dann das Kalomel sich absetzen, gießt die Lösung ab und wiederholt das Waschen 5—6 mal. Zum Schluß wird das Kalomel mit etwas KCl-Lösung in das Elektrodengefäß hineingesogen. Nachdem das Kalomel sich gesenkt hat (es braucht sich nur eine Schicht von minimaler Dicke über dem Hg zu bilden), saugt man das Gefäß mit der 0,1-n-KCl-Lösung fast voll. Das Abflußrohr muß luftblasenfrei gefüllt sein. Der ungefettete Hahn wird geschlossen und die Elektrode an einem Stativ befestigt.

Herstellung einer gesättigten Kalomelelektrode: Die Herstellung dieser Elektrode geschieht in genau derselben Weise, wie sie bei der 0,1-n-Kalomelektrode beschrieben ist. Nur nimmt man als Lösung gesättigte KCl-Lösung und schichtet zum Schluß noch festes, gepulvertes KCl in dichter Schicht über das Kalomel. Diese Elektrode ist gut haltbar.

Die Elektrodengefäße stehen miteinander in leitender Verbindung. Als Verbindungsflüssigkeit dient am besten eine Wanne mit gesättigter KCl-Lösung, in die die Abflußrohre der Elektrodengefäße oder mit ihnen in Verbindung stehende andere elektrolytische Stromschlüssel eintauchen. Bei der Chinhydronmessung werden wir noch weitere Bezugs Elektroden kennen lernen.

Ableitungselektroden: Die gebräuchlichsten Ableitungselektroden sind die Birnenelektrode und die U-Elektrode nach L. Michaelis. Die Ableitungselektroden werden zunächst platinieren. In ein kleines Gefäßchen füllt man einige cm<sup>3</sup> einer Lösung von 1 g Platinchlorid + 0,007 g Bleiacetat in 30 cm<sup>3</sup> Wasser. Die zu platinierende Elektrode wird zuerst mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gereinigt und mit destilliertem Wasser gut abgespült. Die Klemme dieser Elektrode wird dann mit dem negativen Pol

eines 4-Volt-Akkumulators verbunden, die Klemme des Platinierungsgefäßes mit dem positiven Pol, und die Platinelektrode in die Platinlösung eingetaucht. Sie überzieht sich bald mit Platinschwarz. Bei neuen Elektroden soll das Platinieren 5 Minuten dauern, bei schon gebrauchten 1 Minute. Dann wird die Elektrode mit destilliertem Wasser gut gewaschen und bei derselben Stromrichtung wie vorhin kurze Zeit in verdünnter  $H_2SO_4$  polarisiert. Nach dieser Vorbehandlung werden die Elektroden mit destilliertem Wasser gut gewaschen und in die durch eine dünne Wachsschicht gut abgedichteten Elektrodengefäße eingesetzt. Die Elektrodengefäße dürfen niemals leerstehen; werden sie nicht benutzt, so müssen sie mit destilliertem Wasser gefüllt werden.

Birnenelektrode: Zum Gebrauch wird das destillierte Wasser aus der Elektrode entleert und die Untersuchungsflüssigkeit ein-

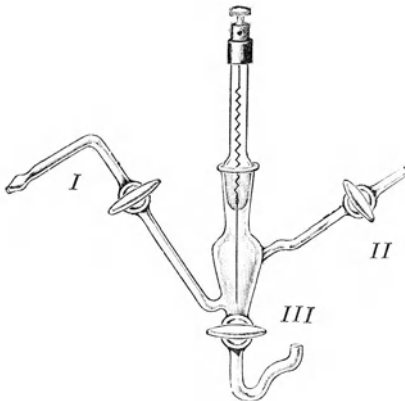


Abb. 38.

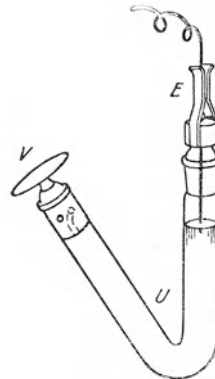


Abb. 39.

gefüllt. Nun wird durch die Elektrode Wasserstoff durchgeleitet. Den Wasserstoff entwickelt man in einem Kippschen Apparat (aus As-freiem Zink und verdünnter Schwefelsäure mit etwas  $CuSO_4$ ) und leitet ihn durch eine Waschflasche mit 2 proz. Lösung von Kaliumpermanganat und durch eine, die mit konzentrierter Sublimatlösung beschickt ist. An der Elektrode ist Hahn *I* geöffnet, Hahn *II* ist ebenfalls geöffnet, Hahn *III* ist geschlossen. Der Wasserstoff muß langsam durch die Flüssigkeit in der Elektrode, die nicht mehr als  $\frac{1}{3}$  des Elektrodeninhalts zu betragen braucht, hindurchperlen; nach drei Minuten schließt man den Hahn *II*, dann den Hahn *I*, öffnet dann den Hahn *III* und stellt zwischen dem Schenkel *T* in der Wanne die Verbindung durch einen mit  $KCl$  getränkten Baumwollfaden oder einen Agarheber

her. Die Agarheber werden auf folgende Weise bereitet: Man biegt Glasröhren von ca. 4 mm Weite □ förmig um und zieht ein Ende aus. Dann kocht man eine Lösung von gesättigter KCl mit 3% Agar auf dem Wasserbade oder im Dampfkochtopf und füllt durch Aufsaugen mit dieser Mischung die vorher angewärmten Glasröhren. Die Agarheber werden in gesättigter KCl-Lösung aufbewahrt.

Hat man die Potentialdifferenz der Kette gemessen, so schließt man den Hahn *III*, öffnet wieder *I* und *II*, und leitet noch einmal Wasserstoff für einige Minuten durch die Flüssigkeit. Ist bei der nun folgenden zweiten Messung die Potentialdifferenz unverändert, so ist die Messung beendet. Andernfalls wiederholt man das Einleiten von Wasserstoff. Diese Birnenelektroden kann man für alle Lösungen gebrauchen, bei denen die  $[H^+]$  nicht durch ein  $\frac{CO_2}{NaHCO_3}$  oder  $\frac{NaHCO_3}{Na_2CO_3}$ -Gemisch definiert wird. Alle Lösungen, bei denen durch Austreiben der  $CO_2$  die Acidität geändert wird, werden nicht mit „strömendem Wasserstoff“ gemessen, sondern in der U-Elektrode mittels der sogenannten „stehenden Wasserstoffblase“.

U-Elektrode. Die Platinierung der U-Elektrode geschieht wie oben für die Birnenelektrode beschrieben. Bei der Einfüllung der Untersuchungsflüssigkeit muß darauf geachtet werden, daß in dem Schenkel, der die Elektrode enthält, keine Luftblase zurückbleibt. Jetzt führt man mittels einer Glascapillare, die man bis an den Scheitel der U-Röhre führt, einige Wasserstoffblasen in den Elektrodenschenkel. Dadurch wird die Flüssigkeit von der Elektrode weggedrängt; die Platinspitze muß aber noch gerade in die Flüssigkeit eintauchen. Hat die Wasserstoffblase am Stopfen die richtige Größe, so füllt man den anderen Schenkel der U-Elektrode völlig mit der Untersuchungsflüssigkeit auf, setzt den Verschlußstopfen unter einer leichten Drehbewegung fest auf und erreicht auf diese Weise, daß die U-Elektrode außer der Wasserstoffblase keinerlei Gas oder Luft enthält. Die Flüssigkeit, die von dem Stopfen verdrängt wird, fließt durch ein kleines Loch ab. Es ist darauf zu achten, daß beim Hereinsetzen des Stopfens die Bohrung im Stopfen auf das Loch in der Elektrodenwand paßt. Durch Drehen des Stopfens verschließt man dann die Stopfenbohrung. Lösungen, die Eiweißsubstanzen enthalten, führen nicht selten zu einer Verunreinigung der Platinelektrode im Elektrodengefäß. Eiweißfasern entfernt man am schonendsten, indem man die Gefäße mit einer schwach alkalischen Trypsinlösung füllt und damit eine Nacht stehen läßt.

Eichung der Kalomelelektrode. Bei der Herstellung der gesättigten Kalomelelektrode wurde gesagt, daß sie gegen die Normalwasserstoffelektrode eine Potentialdifferenz von 0,2503 V (bei 18°) habe. Doch ist es vorteilhaft, sich nicht auf diesen Wert zu verlassen, sondern die Elektrode von Zeit zu Zeit zu eichen. Die Eichung geschieht dadurch, daß man die Potentialdifferenz gegen eine mit Standardacetat gefüllte Wasserstoffelektrode bestimmt. Standardacetat ist eine Lösung von 50 cm<sup>3</sup> n-NaOH + 100 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure + 350 cm<sup>3</sup> Wasser, d. h. eine Lösung von 0,1-n-Essigsäure + 0,1-n-Natriumacetat. Eine Birnenelektrode, die, wie oben beschrieben, platinirt und vorbehandelt ist, wird mit dem Standardacetatgemisch gefüllt und Wasserstoff durchgeleitet (ebenfalls genau in der oben beschriebenen Anordnung). Man schaltet nun die Kalomelelektrode positiv, die Birnenelektrode negativ, stellt die elektrolytische Leitung her und mißt die Potentialdifferenz; die Messung wird von Zeit zu Zeit wiederholt, bis der Wert konstant geworden ist.

Die Millivoltwerte des Standardacetates gegen die gesättigte Kalomelelektrode sind:

bei 15° . . . . .	517,0	bei 21° . . . . .	518,0
„ 16° . . . . .	517,1	„ 22° . . . . .	518,3
„ 17° . . . . .	517,2	„ 23° . . . . .	518,6
„ 18° . . . . .	517,4	„ 24° . . . . .	519,0
„ 19° . . . . .	517,5	„ 25° . . . . .	519,5
„ 20° . . . . .	517,8	„ 34—38° . . . . .	520,0—520,5.

L. Michaelis gibt folgende allgemeine Vorschrift für die  $p_h$ -Messung einer beliebigen Flüssigkeit:

1. Man mißt am Tage des Versuches zunächst den Potentialunterschied der gesättigten Kalomelelektrode gegen eine Wasserstoffelektrode mit Standardacetat. Man findet das Potential  $E_0$ .

2. Man mißt den Potentialunterschied derselben Kalomelelektrode gegen eine Wasserstoffelektrode, die mit der zu messenden Lösung gefüllt ist. Man findet das Potential  $E_x$ .

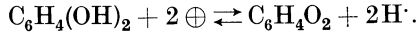
3. Man berechnet die Differenz  $E_x - E_0 = E$  in Millivolt und dividiere dies mit  $\vartheta$  (vgl. S. 64). Die auf diese Weise erhaltene Zahl wird zu 4,62 algebraisch addiert (also, wenn sie eine negative Größe war, von 4,62 subtrahiert). Das erhaltene Resultat ist das  $p_h$  der zu messenden Lösung.

### Chinhydronelektrode.

An Stelle von Wasserstoffelektroden werden in neuerer Zeit häufig Chinhydronelektroden benutzt. Hierbei fällt das Einleiten von gasförmigem Wasserstoff fort. Das Elektrodenpotential

ist ein sog. Oxydations-Reduktionspotential, das von der  $[H^{\cdot}]$  der Lösung abhängt.

Das Chinhydron ist eine äquimolekulare Verbindung von Chinon und Hydrochinon und zerfällt in wässriger Lösung in seine beiden Komponenten. Zwischen dem gelösten Chinon und Hydrochinon stellt sich ein Gleichgewicht ein, das durch folgende Formel ausgedrückt werden kann:



Daraus läßt sich als Elektrodenpotential  $E$  herleiten

$$E = 0,0577 \log \frac{K \text{ Chinon}}{\text{Hydrochinon}} \cdot [H^{\cdot}].$$

Bei Anwendung von Chinhydron wird das Verhältnis von Chinon: Hydrochinon = 1, also

$$E = 0,0577 \log K + 0,0577 \cdot \log [H^{\cdot}]$$

bei  $18^{\circ}$ .

Für  $H = \frac{n}{1}$  (Normalwasserstoffelektrode) ist

$$E = 0,0577 \log K (18^{\circ}) = E_0.$$

Bei jeder anderen  $[H^{\cdot}]$  ist

$$E = E_0 + 0,0577 \log [H^{\cdot}],$$

also

$$\log [H^{\cdot}] = \frac{E - E_0}{0,0577}$$

und

$$p_h = \frac{E_0 - E}{0,0577}$$

$E_0$  ist der Potentialunterschied zwischen einer Chinhydron- und einer Wasserstoffelektrode, die mit einer Lösung von  $\frac{n}{1} H^{\cdot}$  gefüllt sind. Dieser beträgt nach E. Bijlmann bei  $18^{\circ}$  0,7044 Volt<sup>1)</sup>. Mißt man nicht gegen die  $\frac{n}{1}$  Wasserstoffelektrode, sondern gegen eine Kalomelektrode (1/10 oder gesättigt), so lauten die Gleichungen:

$$1. \quad p_h = \frac{0,3665 - \pi_{0,1n}}{0,0577} \quad (\text{bei } 18^{\circ})$$

und  $\pi_{0,1n} = EMK$  gegen  $1/10$ -n-Kalomelektrode,

$$2. \quad p_h = \frac{0,4568 - \pi_{\text{gesättigt}}}{0,0577} \quad (\text{bei } 18^{\circ})$$

<sup>1)</sup> Als Temperaturkoeffizient (zwischen  $18^{\circ}$  und  $25^{\circ}$ ) kann  $-0,77$  Millivolt angesetzt werden.





gefäße, die Bezugs- und Ableitungselektrode gemeinsam enthalten<sup>1)</sup>).

Lösungen, die stark eiweißhaltig sind, können einen nicht unbeträchtlichen Eiweißfehler geben. Da andererseits diese Lösungen gut gepuffert sind, so wird man durch Verdünnen, ohne Änderung der  $[H^+]$  die Eiweißkonzentration soweit herabsetzen können, daß der Fehler nicht in Betracht kommt. In allen Fällen erhält man bei einem  $p_n$ , der kleiner als 7,5 ist, gute Resultate. Organbrei lassen sich nicht gut mit einer Platinelektrode und Chinhydron messen. Bei Blut ließ sich durch Einführung der Goldelektrode die Chinhydronmessung durchführen. Lecithinsole in 0,1prozentiger Konzentration sind mit Chinhydron gut meßbar. Caseinlösungen und Molkereiprodukte sind ebenso ohne jeden Fehler meßbar<sup>2)</sup>).

Die optimalen Wasserstoffionenkonzentrationen der verschiedenen Fermente sollen hier nach einer sehr dankenswerten tabellarischen Zusammenstellung von Euler aus seiner Chemie der Enzyme, 3. Aufl., S. 70—73 gebracht werden.

mehrere Pröpfchen ein, die man jedesmal mit einer breiten Stricknadel möglichst feststampft, bis der Schenkel etwa 0,5 cm hoch damit erfüllt ist. Danach verbindet man beide Querschlenkel mit einem Stückchen Gummischlauch und füllt das so entstandene H-Rohr bis etwas über dieselben mit dem Elektrolyten mit Hilfe eines Capillartrichters. Schließlich wird über die noch offenen Enden ein längerer Gummischlauch geschoben. Vorausgesetzt, daß das Filtrierpapier recht fest eingestampft wurde, hält dieser Stromschlüssel seinen Inhalt wochenlang; eine Diffusion durch denselben fällt außer Betracht, sein Widerstand läßt sich in mäßigen Grenzen halten.“ Vgl. Müller: Elektrochemisches Praktikum, 4. Auflage. 1924, S. 19, Abb. 10. Dresden und Leipzig.

<sup>1)</sup> Siehe Biochem. Zeitschr. Bd. 159, S. 76.

<sup>2)</sup> Kolthoff: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 144, S. 259. 1925. Vgl. auch Fr. Auerbach und E. Šmolezyk: Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. 110, S. 65. 1924.

Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
Davidsohn	Biochem. Zeitschr. Bd. 45, S. 284. 1912	Takata: Bioch. Journ. (Japan) Bd. 1, S. 107. 1922
Rona u. Bien	Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 249. 1913	
	Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 100. 1914	Rona: Bioch. Zeitschr. Bd. 33, S. 413. 1911. Rona und Bien: (Pankreas v. Rind) Biochem. Zeit- schr. Bd. 64, S. 13. 1914
Rona u. Pavlovic	Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 108. 1923	

Enzym	Bemerkung	Aciditäts- optimum d. Wirksamkeit
	Schweinepankreas	8—9 abhängig v. Aktivatoren
gereinigt	Lipase aus Pankreas u. Magen des Schweines	8—9
In höheren Pflanzen		aus Ricinus
	Acetatpuffer (0,5—0,1 norm.)	5,0
Amylasen	Chlorid-A. 6,7 Nitrat-A. 6,9 Phosphat-Sulfat Acetat-A. 6,1—6,2	6
In höheren Tieren . . .	Pankreas	6,8
	„	6,8
	Speichel	6,5 (PO <sub>4</sub> -Puffer)
	„	6,5
	Leber	6,9 (0,3 norm. PO <sub>4</sub> -Puffer)
In Pflanzen. . . . .	Malz	5,0
	„ Kartoffel	4,9 6—7 (?)
	Bohnen	5
	Asperg. Oryzae	4,8
Maltase: resp. $\alpha$ -Methylglucosidase	aus Bierhefe	6,2—6,8

Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 93 u. 132. 1923	Willstätter und Memmen: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 129, S. 1. 1923
Willstätter und Memmen	Zeitschr. f. physiolog. Bd. 133, S. 229. 1924	
Haley und Lynau	Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 43, S. 2664. 1921	Die aus Jalanders Zahlen (Biochem. Zeitschr. Bd. 36) berechnete Acidität 3,7—2,9 ist zu hoch
Willstätter u. Waldschmidt-Leitz	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 161. 1924	
Michaelis und Pechstein	Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 77. 1914	
Shermann, Thomas und Baldwin	Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 41, S. 231. 1919	
Willstätter, Waldschmidt-Leitz, Hesse	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 126, S. 143. 1923	
Hahn und Michaelis	Zeitschr. f. Biol. Bd. 73, S. 10. 1921	
Ernström	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 119, S. 190. 1921	
O. Holmbergh	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 68. 1924.	Michaelis (Monograph.) 6,7—5.
Euler u. Svanberg	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 112, S. 193. 1921	
Adler	Biochem. Zeitschr. Bd. 77	
Falk	Journ. Gen. Phys. Bd. 2	
Sjöberg	Biochem. Zeitschr. Bd. 133, S. 218. 1922	
Sherman, Thomas, Baldwin	Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 41, S. 231. 1919	
Rona und Michaelis	Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70. 1913; Bd. 58. S. 148. 1913	

Enzym	Bemerkung	Aciditäts- optimum d. Wirksamkeit
		6,8
Saccharase in tier. Organen	Darm (Mensch)	5—7
in Pflanzen . . . . .	Kartoffel	4
in Hefen . . . . .	52,1°	4,4—4,6
	22,3°	4,2
	in frischen Hefezellen	4,2—5,2
in Takadiastase . . . . .		5,0—5,5
in Penicill. glaucum.		5
Lactase:	in Emulsin	4,2—4,6
	in Milchzuckerhefen	7
$\beta$ -Glucosidase . . . . .	Substrat Salicin	4,4
		4,7
	Substr. $\beta$ -Methylglucosid	4,4

Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
Willstätter, Kuhn, Sobotka	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 224. 1924	Willstätter und Stei- belt: Zeitschr. f. phy- siolog. Chem. Bd. 115, S. 199. 1921
Euler und Svanberg  Falk  Sörensen	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 43, 1921 Gen. Phys. Bd. 2  Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131. 1909	Euler und Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 120, S. 1. 1922. Euler, Joseph- son und Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134. 1924
Michaelis und David- sohn	Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 386. 1911	
Euler und Emberg  Kuhn	Zeitschr. f. Biol. Bd. 69, S. 349. 1919 Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 129, S. 57. 1923	
Euler, Josephson u. Söderling Avery, Cullen	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 136 Jl. exp. Med. 32. 1920 Jl. exp. Med. 35. 1922	
Willstätter und Csá- nyi	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 172. 1921	
Willstätter und Op- penheimer  Vulquin	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 118, S. 168. 1922  Soc. Biol. Bd. 70, S. 270, 763. 1911.	Fischer, E.: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 107, S. 176. 1919. Ver- schiedene $\beta$ -Glucoside, Mittel 5
Helferich	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 159. 1921	
Willstätter und Csá- nyi	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 172. 1921	Willstätter u. Oppen- heimer: Zeitschr. f. phy- siolog. Chem. Bd. 121, S. 183. 1922. Verschiedene $\beta$ -Glucoside 4,4 bis 5,3.

Enzym	Bemerkung	Aciditäts- optimum d. Wirksamkeit
Urease . . . . .	<i>p<sub>h</sub></i> -Optimum ändert sich etwas mit der Harnstoffkonzentrat.	7,2—7,5
Magen-Pepsin . . . . .	Verdauung von Acidalbumin bei 37°	1,6—1,8
	Verdauung von Edestin bei 37°	1,4
	Eier-Albumin	2,2—2,5
	Gelatine	2—2,8
	Serum-Albumin	2,0
Hydrolyt. Bestandteile des Chymosins . . . . .	Substrat Casein	5
Pankreas-Trypsin	verschiedene Substrate	7,4—10
	Gelatine	8,2—8,7
Pankreatin (Trypsin-Erepsin-Mischung)	Peptonspaltung 37°, Formolmethode 37°	8
		8
Tryptase aus Rindsdarm	Casein 37°	9
Erepsin aus Schweinsdarm	Substrat Glycylglycin 37°	8,6
Erepsin (Hefepreßsaft)	Glycylglycin 37°	7,8
Proteolyt. Enzyme im Autolyse-Saft der Hefe (Enzymgemisch nach Vines)	Setzt sich nach Dernby zusammen aus: Pepsin Opt. 4,5, Tryptase Opt. 7,0, Ereptase Opt. 7,8	6

Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
v. Slyke und Zacharias	Biol. Chem. Bd. 19, S. 181. 1914	Lövgren: Biochem. Zeitschr. Bd. 119, S. 215. 1921 u. Bd. 137, S. 206. 1923. Rona u. György: Biochem. Zeitschrift Bd. 111, S. 115. 1920
Sörensen	Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131. 1919	Michaelis und Davidsohn: Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 8, S. 2. 1910
Michaelis und Mendelsohn Northrop	Biochem. Zeitschr. Bd. 61, S. 1. 1914 Journ. of gen. physiol. Bd. 2, S. 113. 1920; Bd. 3, S. 211. 1920	Ringer: Arch. neerland. de physiol. de l'homme et des anim. Ferner Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 95 u. Kolloid-Zeitschr. Bd. 19 Okada: Journ. of biochem. Bd. 10
Gyemant	Biochem. Zeitschr. Bd. 105	
van Dam	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 61, S. 147. 1909	
Northrop	Journ. of gen. physiol. Bd. 5, S. 263. 1922	
Waldschmidt-Leitz	Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 132, S. 181. 1924	
Michaelis und Davidsohn Kurt Meyer	Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 280. 1911 Biochem. Zeitschr. Bd. 32, S. 274. 1911	Palitzsch u. Walbum: Biochem. Zeitschr. Bd. 47, S. 1. 1912; Opt. 9,7
Hedin	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 130, S. 45. 1923	
Euler	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 51, S. 213. 1907	
Dernby	Meddel. fra Carlsberg laborat. Bd. 11, S. 139. 1916	
Dernby	Inaug.-Diss. Stockholm 1917	



Enzym	Bemerkung	Aciditäts- optimum d. Wirksamkeit
Proteolyt. Enzyme im Hefe-Mazerationssaft	Spaltung von Polypeptiden. Opt. nach Abderhalden u. Fodor abhängig von Substrat	6,7—8,5
Proteolyt. Enzyme im Autolysesaft von tier. Geweben und Leukocyten	Setzt sich nach Dernby zusammen aus: Pepsin Opt. 3,0 bis 3,5, Trypsin Opt. 7,8, Erepsin Opt. 7,8	
Leber . . . . .		3,6—3,9
Proteolyt. Enzyme verschiedener Organe:		
Pferdenieren . . . . .	a) Casein b) Pepton	4,3—5,6 4,8
Lymphdrüsen . . . . .	a) Casein b) Casein c) Pepton	5,5 9—10 8
Milz . . . . .	a) Casein b) Casein c) Pepton	etwa 5,4 8,8 7,5—8,5
Chymosin . . . . .	Optimum d. Labfällung des Caseins in Gegenwart v. Ca.	6,4—6,0 5 (?)
	Umwandl. Casein in Paracas.	6,0—6,4
Enzym-Komplex d. alkohol. Gärung	in lebend. Hefe ohne Stickstoffnahrung 28°	4,5—5,5
	mit Hefenwasser (Co-Enzym u. Stickstoffnahrung) 28°	4,5—6,5
in Trockenhefe . . . . .		6,2—6,8
Katalase . . . . .	Leber 0°	7
	18°: Abhängig von Neutralsalzen	etwa 7
	Leber	etwa 7

Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
Abderhalden und Fodor	Fermentforschung Bd.1, S. 533. 1916. Siehe dazu Dernby: l. c.	
Rona und Mislowitzer	Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 517. 1923	
Hedin	} Zeitschr. f. physiolog. Bd. 122, Chem. S. 307. 1922	
	} Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 289. 1923	
	} Biol. Chem. Bd. 54, S. 177. 1922	
Michaelis und Mendelsohn	Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 305. 1914	
van Dam	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 64, S. 316. 1910	
Rona und Gabbe	Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 39. 1922	Euler und S. Karlsson: Biochem. Zeitschr. Bd. 130, S. 550. 1920
	Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 7, S. 21. 1919	
Euler und Heintze	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 108, S. 165. 1919	
Euler und Myrbäck	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 131, S. 179. 1923	
Sörensen	Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131. 1909	Hennichs: Biochem. Zeitschr. Bd. 145, S. 286. 1924
Michaelis und Pechstein	Biochem. Zeitschr. Bd. 53, S. 320. 1913	
Rona und Dambovicanu	Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 20. 1922	

## Aktivatoren und Paralytoren.

Alle Stoffe bekannter oder unbekannter chemischer Zusammensetzung, welche die Geschwindigkeit des Umsatzes erhöhen (also auch für die Anfangsgeschwindigkeit = 0) können Aktivatoren genannt werden, und wenn sie die Geschwindigkeit herabsetzen, Paralytoren. Der Mechanismus dieser Förderung oder Hemmung ist sehr häufig unbekannt. Als Möglichkeiten kommen in Frage: Änderung der aktuellen Acidität, Salzwirkungen, Änderung der Dissoziation des Substrates und der des Fermentes, Änderung der Affinität von Enzym oder Substrat, Beeinflussung der Adsorptionsbedingungen (Adsorptionsherstellung oder Verdrängung [Lipasen]). Aktivator bekannter Konstitution ist z. B. das Kochsalz als Aktivator für die tierischen Amylasen (s. diese), von unbekannter Konstitution sind das Co-Enzym der Gärung und die Enterokinase des Trypsins.

Bei den Paralytoren kann man unterscheiden zwischen Hemmungen reversibler und irreversibler Natur. Eine reversible Hemmung ist z. B. die Hemmung der Saccharasewirkung durch Silbersalze<sup>1)</sup>. Ein anderes Beispiel ist die Hemmung der Katalaseeinwirkung durch HCN<sup>2)</sup> oder die Hemmung einzelner Lipasen durch Alkaloide, bes. Chinin<sup>3)</sup>. Besonders schön läßt sich eine reversible Vergiftung am Beispiel der Wirkung von KCN auf die Katalasewirkung zeigen (vgl. S. 303).

Hier wären auch die sogenannten spezifischen Hemmungen durch die Abbauprodukte zu erwähnen, die in ihrer Größenordnung zuerst von Michaelis bestimmt wurden<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Euler u. Svanberg: Fermentforschung Bd. 3, S. 330; Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 114, S. 1137. — Euler u. Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 121, S. 177. — Euler u. Walles: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 167.

<sup>2)</sup> Vgl. z. B. Rona, Fiegel u. Nakahara: Biochem. Zeitschr. Bd. 160, S. 272.

<sup>3)</sup> Siehe Rona u. Mitarbeiter: Biochem. Zeitschr. Bd. 118, S. 185, 213; Bd. 130, S. 225, 582; Bd. 134, S. 108, 130.

<sup>4)</sup> S. z. B. Willstätter u. Kuhn: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 180 und Kuhn: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 28 und Bd. 125, S. 1.

## Spezieller Teil.

### A. Fettsplattende Fermente (Esterasen, Lipasen).

Die Esterasen bzw. Lipasen spalten Fette und einfache Ester in ihre Komponenten Alkohol (Glycerin) und Säuren. Pankreaslipase, Leberlipase und Magenlipase verhalten sich stereochemisch verschiedenen racemischen Substraten gegenüber verschieden, sind also als verschiedene Fermentarten zu betrachten.

Die Pankreaslipase verschiedener Tiere wirkt gleichmäßig auf Fette und Tributyrin, Triacetin, Methylbutyrat, während die Leberlipase niedere Ester sehr gut, Neutralfette (z. B. Olivenöl) sehr schlecht angreift. Wie Pankreaslipase verhält sich die Magenlipase.

#### Pankreaslipase.

Als Substrate verwendet man natürlich vorkommende Fette (Olivenöl) oder synthetische Ester (Tributyrin, Monobutyrin, Triacetin usw.). Alle Glycerinester sind durch Pankreaslipase spaltbar; aromatische Ester werden kaum angegriffen. Auch auf Isobuttersäureester und andere Verbindungen mit verzweigter Kohlenstoffkette wirkt sie sehr träge. Die Pankreaslipase ist völlig klar löslich in Wasser; ebenso in Glycerin. In Glycerin ist sie beständig, in Wasser unbeständig; daher sind rein wässrige Auszüge für präparative Zwecke nicht zu empfehlen. Nach Willstätter und Memmen hemmen Proteine und gallensaure Salze im sauren, fördern dagegen im alkalischen Gebiet.  $\text{CaCl}_2$  ist im sauren Gebiet ohne Wirkung, im alkalischen wirkt es aktivierend. Auch die Ölsäure hemmt im sauren Gebiet; Alkohol und Glykol wirken intensiv schädlich, wie überhaupt alle capillaraktiven Stoffe<sup>1)</sup> 2). Glycerin wirkt bis 30% aktivierend, sowohl bei Olivenöl als auch bei Methylbutyrat als Substrat.

Förderung und Hemmung sind aber auch von den Substraten abhängig. Auf die Tributyrinhydrolyse übt das Albumin in Gegenwart von Natriumoleat einen aktivierenden Einfluß aus.

<sup>1)</sup> Vgl. Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 93. 1922 und Bd. 129, S. 1. 1923; Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 229. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 229. 1923.

Darstellung: a) Nach Rosenheim<sup>1)</sup>. Frisches, feingehacktes Schweinepankreas wird mit 2 Gewichtsteilen Glycerin angerührt und nach 24 Std. durch ein feines Tuch koliert. Von der stark opaleszierenden Flüssigkeit wird ein Teil, z. B. 30 ccm, mit der 10fachen Menge destillierten Wassers vermischt. Damit der entstandene Niederschlag sich absetzt, säuert man mit Essigsäure bis zur eben schwach sauren Reaktion gegen Lackmus an, hebert oder gießt dann am folgenden Tag die klare Flüssigkeit vom Niederschlag ab, versetzt ihn nochmals mit 300 ccm Wasser, wenn nötig nochmals unter Zusatz von sehr wenig Essigsäure. Nach einiger Zeit wird wieder dekantiert, die übrigbleibende Flüssigkeit mit dem Niederschlag auf gehärtetem Papier abgenutscht und auf dem Filter noch einige Male mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Der Niederschlag wird in einer kleinen Reibschale mit 20 ccm Glycerin verrieben, wobei er fast in Lösung geht, und die nicht filtrierte Lösung wird direkt zum Versuch verwendet.

b) Nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz<sup>2)</sup>. Als Ausgangsmaterial dient das bei Trypsin S. 234 beschriebene Trockenpulver aus Schweinepankreas. Das Pulver wird, wie dort geschildert, mit der 16fachen Menge 87proz. Glycerins ausgezogen. Von der Hauptmenge der ungelösten Drüsensubstanz wird der Glycerinextrakt durch Zentrifugieren bei hoher Tourenzahl getrennt, der noch stark getrübe Glycerinauszug mit Wasser verdünnt und durch erneutes Abschleudern geklärt. (Will man die trüben Glycerinextrakte verwenden, so sollen diese unmittelbar vor dem Versuch mit Wasser versetzt werden.) Z. B. werden aus 100 g des Pankreaspulvers durch 4—8 stündiges Digerieren mit Glycerin bei 30° nach  $\frac{1}{2}$  stündigem Zentrifugieren bei hohen (z. B. 6000) Umdrehungen in der Minute annähernd 1600 cm<sup>3</sup> trüber Rohextrakt gewonnen. Von dem Glycerinauszug wird ein bestimmtes Quantum (z. B. 500 cm<sup>3</sup>) mit der 5fachen Menge Wasser versetzt. Der entstandene Niederschlag wird durch kurzes Zentrifugieren bei geringer Tourenzahl (2500 Touren) abgetrennt.

Die Lipase läßt sich aus den Glycerinauszügen durch Aluminiumhydroxyd und durch Kaolin leicht adsorbieren. Der Adsorptionswert ist die Enzymmenge in Lipaseeinheiten (vgl. S. 100 und 102), die von 1 g Adsorbens unter bestimmten Bedingungen aufgenommen wird. Anders wie beim Invertin, das mit steigendem Reinheitsgrad viel reichlicher adsorbiert wird, findet man bei Lipase kein Anwachsen des Adsorptionswertes bei stei-

<sup>1)</sup> Nach Pekelharing, C. A.: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 81, S. 356. 1912.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 132, 175. 1922.

gendem Reinheitsgrad und bei größerer Verdünnung. Die Begleitstoffe üben also einen verhältnismäßig geringen Einfluß auf die Adsorption der Lipase aus, und zwar keinen hemmenden. Beim Eluieren der Adsorbate ist die Abhängigkeit von den Begleitstoffen größer. Für den Gang der Adsorption soll hier ein Beispiel aus der Arbeit von Willstätter und Waldschmidt-Leitz gegeben werden.

Erste Adsorption. Ein durch Verdünnen mit Wasser und Zentrifugieren geklärter Glycerinauszug (2930 cm<sup>3</sup> mit 1397 Lipaseeinheiten) wird mit  $\frac{1}{100}$  des Volumens an n-Essigsäure angesäuert (30 cm<sup>3</sup>) und mit einer Tonerdesuspension der Darstellung B geschüttelt (vgl. S. 141) (750 cm<sup>3</sup> mit 6,975 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Es wird 5 Min. bei 2500 Umdrehungen zentrifugiert. In der Restlösung sind nur noch 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> der ursprünglichen Lipasemenge.

Erste Elution: Das Adsorbat wird in den Zentrifugengläsern mit 1200 cm<sup>3</sup> 20 proz. Glycerin gewaschen und darauf zweimal mit je 600 cm<sup>3</sup> „Ammonphosphat“ eluiert ( $2\frac{1}{3}$  basisch. Ammonphosphat: 57 Volumteile 1 proz. Diammonphosphatlösung, 3 Teile n-NH<sub>3</sub> und 40 Teile 87 proz. Glycerin). Die in der Zentrifuge vom Tonerdeschlamm abgetrennten (10 Min. 3600 Umdr.) Elutionen werden zur Stabilisierung mit  $\frac{1}{3}$  des Gesamtvolumens an 87 proz. Glycerin versetzt, da in wässriger Lösung Fermentverluste eintreten (Glyceringehalt: 50<sup>0</sup>/<sub>0</sub>). Die Elution enthielt  $\frac{2}{3}$  der angewandten Lipase, begleitet von nur  $3\frac{1}{2}$ <sup>0</sup>/<sub>0</sub> der anfangs vorhandenen Amylase. Zur zweiten Adsorption wird zuerst die Phosphorsäure entfernt. Die 50<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Glycerin enthaltende Elution (1550 cm<sup>3</sup>) wird mit Wasser (2820 cm<sup>3</sup>) verdünnt und mit gleichen Teilen n-NH<sub>4</sub>Cl und n-NH<sub>3</sub> (je 54 cm<sup>3</sup>) versetzt. Unter kräftigem Umschütteln wird die Phosphorsäure mit 10 proz. Magnesiumacetlösung (116 cm<sup>3</sup>) ausgefällt.

Zweite Adsorption. Das phosphatfreie Filtrat (4350 cm<sup>3</sup>) wird mit n-Essigsäure (50 cm<sup>3</sup>) angesäuert, mit 700 cm<sup>3</sup> Tonerdesuspension (6,510 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Sorte B) geschüttelt und abzentrifugiert (5 Min., 3400 Touren).

Zweite Elution. Das Adsorbat wird sogleich zweimal mit je 500 cm<sup>3</sup> „Ammonphosphat“ eluiert, die Lösungen abzentrifugiert (5 Min., 3600 Touren) und vereinigt. Die Elution enthielt 35<sup>0</sup>/<sub>0</sub> der Lipase des geklärten Glycerinauszuges.

Das Resultat kann noch verbessert werden, wenn die Konzentration des Glycerins bei Ausfällung der Phosphorsäure nur 10 bis 15<sup>0</sup>/<sub>0</sub> beträgt und das Fällungsmittel langsam unter kräftigem Umschütteln eingetragen wird.

Eine weitere Reinigung des Fermentes gelingt durch Adsorp-

tion mittels elektroosmotisch gereinigtem Kaolin (von der Elektro-Osmose A. G., Wien); dabei verschwinden die Eiweißreaktionen des Präparates, und die enzymatische Konzentration wird um das 8fache gesteigert.

Beispiel<sup>1)</sup>: Als Ausgangsmaterial dient die 50% Glycerin enthaltende, durch zweimalige Adsorption und Elution mittels  $\text{Al}_2\text{O}_3$  bzw. Ammonphosphat gereinigte Lösung. Diese (1600  $\text{cm}^3$  mit 1152 Lipaseeinheiten) wird mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und mit n-Essigsäure (40  $\text{cm}^3$ ) angesäuert. Mit 300  $\text{cm}^3$  einer Suspension, die (72 g) elektroosmotisch gereinigtes Kaolin enthält, wird geschüttelt, 10 Min. lang bei 2500 Umdr. zentrifugiert und das Adsorbat ohne Waschen sogleich in den Zentrifugengläsern zweimal mit je 400  $\text{cm}^3$  „Ammonphosphat“ angerührt. Die Elution wird durch Zentrifugieren vom Schlamm getrennt, wobei sich die Hauptmenge fest zusammenklumpt, während manchmal ein Teil des Kaolins kolloidal in Lösung geht. Die Lipaselösung (770  $\text{cm}^3$ ) stabilisiert man zur Aufbewahrung über Nacht, indem man sie durch Zusatz von Glycerin (260  $\text{cm}^3$ , 87 Proz.) auf einen Gehalt von 50% bringt. Die gesamte Elution enthält 65% vom angewandten Enzym. Die Klärung der Enzymlösung gelingt durch Absaugen auf gehärtetem Filter, das mit einer dünnen Haut von Kieselgur bedeckt ist.

Zur weiteren Reinigung dient eine Adsorption mittels einer feinen Suspension von Tristearin oder Cholesterin. Diese Suspension wird hergestellt, indem man 1 Teil Stearin oder Cholesterin auf 15 Teile 87 Proz. Glycerin gibt und darin schmilzt. Beim Erkalten muß die Lösung kräftig geschüttelt werden. Phosphat wirkt der Adsorption durch Tristearin entgegen. — Die Isolierung der Lipase aus diesen Adsorbaten erfolgt durch Auflösen des Tristearins oder Cholesterins in Benzol.

Beispiel<sup>2)</sup>: Je 600  $\text{cm}^3$  einmal durch Tonerde gereinigte Lipaselösung, deren Anfangskonzentration an Glycerin durch Verdünnen von 50 auf 20% herabgesetzt wurde, werden mit a) 15 g Tristearin, b) 15 g Cholesterin in je 225  $\text{cm}^3$  87 prozentigem Glycerin fein verteilt, 10 Min. lang unter häufigem Schütteln behandelt.

Die Restlösung wird durch gehärtete Filter abgesaugt. Die Adsorbate (die 70% der angewandten Lipase enthalten) werden sorgfältig mit Wasser gewaschen und das Präparat 2—3 Tage im Hochvakuum zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Herauslösen des organischen Adsorptionsmittels geschieht mittels Benzol (je 250  $\text{cm}^3$ ), das ungelöste Ferment wird mittels der Zentrifuge

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 182.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 191.

getrennt, wiederholt in den Zentrifugengläsern mit Benzol, absolutem Alkohol und reinem Äther gewaschen und getrocknet. Es sei bemerkt, daß mit der Dialyse der glycerinhaltigen Enzymlösung eine irreversible Inaktivierung der Lipase einhergeht.

### Leberlipase.

Darstellung nach Willstätter und Memmen<sup>1)</sup>. Wie bei der Fermentdarstellung aus Pankreas, wird die Leber (meist vom Schwein) mit Aceton getrocknet und das Ferment darauf mit Wasser oder Glycerin in Lösung gebracht. Die Lipase wird aus dem Organpulver am besten mit Ammoniak ausgezogen, und zwar empfiehlt es sich, 1 g Pulver mit 50 cm<sup>3</sup> 0,025-n-NH<sub>3</sub> anzurühren; man läßt 1½—2 Std. stehen und zentrifugiert; diese Behandlung wird mehrere Male wiederholt. Die erhaltenen Lösungen werden vereinigt und im warmen Luftstrom abgedampft. Reinere Esteraselösungen gewinnt man mit Glycerin, sie waren aber für die folgenden Reinigungsoperationen wenig geeignet. Beim Fällen mit Alkohol und Äther verlor das Enzym seine Wirksamkeit.

Man kann mittels Kaolin oder Tonerde aus saurer Lösung bei  $p_h = 4,2$  bis 4,4 (eingestellt mit Ammonacetat-Essigsäuremischung) den größten Teil der Lipase adsorbieren.

Beispiel<sup>1)</sup>: Durch Ausziehen mit verdünntem Ammoniak und Abdampfen gewonnenenes Präparat, 15 g, werden in 1800 cm<sup>3</sup> Wasser unter Zusatz von 30 cm<sup>3</sup> 0,25-n-NH<sub>3</sub> gelöst und nach Versetzen mit 30 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure mit 15 g elektroosmotisch gereinigtem Kaolin adsorbiert (zu 90%) und abzentrifugiert. Mit 0,25-n-Ammoniak (1500 cm<sup>3</sup>) wird das Adsorbat eluiert, sofort zentrifugiert und im Vakuum<sup>2)</sup> auf  $\frac{1}{10}$  seines Volumens eingedampft. Die Lösung wurde auf der Nutsche durch eine dünne Schicht von Kieselgur klar abgesaugt. In allen Stadien der Reinigung waren die Lösungen ohne Glycerinzusatz lang genug haltbar und ließen sich unter Erhaltung des Enzymwertes auch zur Trockne eindunsten. Die Lösung kann durch Elektrodialyse noch weiter gereinigt werden; die von ausgeschiedenen Flocken in der Zentrifuge befreite Lösung hatte 15% von dem Ferment verloren<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 216 (237). 1924.

<sup>2)</sup> Willstätter, Graser und Kuhn verwenden eine Ölpumpe statt der Wasserstrahlpumpe, ferner eine kupferne 5-Liter-Saugflasche statt einer gläsernen als Vorlage und eine Sole von — 20° zum Durchströmen des Metallkühlers und des die Vorlage enthaltenden Bottichs (Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 123, S. 30. 1922).

<sup>3)</sup> Zur Elektrodialyse vgl. Willstätter u. Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 193 (208). 1923; ferner Fricke, R. u. P. Kaja: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 57, S. 310. 1923/24.



Beispiel für Adsorption mit Tonerde: 1,5 g wie oben gewonnenes Präparat wurden unter Zusatz von 12 cm<sup>3</sup> 0,25-n-NH<sub>3</sub> in 48 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst, nach Ansäuern mit 12 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure mit 40 cm<sup>3</sup> Tonerdesuspension C (vgl. S. 141) (0,2452 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) adsorbiert. Die mit 100 cm<sup>3</sup> 0,25-n-NH<sub>3</sub> gewonnene Elution rasch auf 76 cm<sup>3</sup> eingengt, durch Kieselgur filtriert (75<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Ausbeute).

Der Zusatz von CaCl<sub>2</sub> mit Natriumoleat und Albumin wirkt auf Leberlipase hemmend. Auch bei gereinigten Präparaten war dies Verhalten zu beobachten.

Kräftig spaltende Präparate, die im Laufe eines Jahres ihre Wirksamkeit behielten, stellte Knaffl-Lenz aus Rindsleber dar<sup>1)</sup>. Der Preßsaft der Rinderleber wurde mit dem 3fachen Volumen Glycerin versetzt und im Vakuumexsiccator über Kaliumhydroxyd 14 Tage stehen gelassen, wodurch den Extrakten der größte Teil des Wassers entzogen wurde. Durch scharfes Zentrifugieren konnten 3 Schichten getrennt werden, von denen die mittlere, braunrote Flüssigkeit die Lipase enthielt. Die Glycerinlösung wurde nun auf der Nutsche durch einen dicken Filtrierpapierbrei getrieben.—Dieser Glycerinextrakt wurde bei den Versuchen von Äthylbutyrat und Monobutyrin benutzt. — Weitgehende Reinigung wurde so erzielt, daß der Glycerinextrakt durch Zusatz von sekund. Natriumphosphat alkalisch gemacht wurde, dann mit Kaolin geschüttelt und über Kieselgur filtriert wurde, das Filtrat wird mit CaCl<sub>2</sub> und NaOH versetzt und nochmals filtriert. Das stark wirksame, klare Filtrat gibt durch Zusatz von wenig Säure (etwa  $p_h = 6,2$ ) einen flockigen (enzymatisch fast unwirksamen) Niederschlag, der abzentrifugiert wurde.

### Magenlipase.

Darstellung nach R. Willstätter und Fr. Memmen und nach R. Willstätter, F. Haurowitz und Fr. Memmen<sup>2)</sup> Magen von Hund oder Schwein werden kurz nach dem Schlachten herausgenommen, mit einem scharfen Wasserstrahl gereinigt. Darauf wird nach Entfernung des Oesophagus und des Pylorusteiles die Magenschleimhaut von der Muskulatur und Tunica propria abgetrennt. Die Schleimhaut wird zermahlen und in die doppelte Menge Acetons eingetragen. Nach 2 Std. wird sie nochmals in dieselbe Menge frischen Acetons gebracht. Das mit Äther und Aceton gewaschene und getrocknete Material wird zu einem sehr feinen Pulver zermahlen. Der Kardiateil der Schleimhaut vom Schwein ist viel reicher an Lipase als

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. exp. Pharmakol. u. Pathol. Bd. 97, S. 242. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 247 und Bd. 140, S. 203. 1924.

der Fundusteil; beim Hund war eine Teilung in Kardial, Fundus und Pylorus ohne Vorteil. Das so erhaltene Pulver wird ca. 2 Std. mit der 50fachen Menge  $n/40$  Ammoniak behandelt. Die ammoniakalischen Auszüge sind unbeständig, können aber nach Einstellung einer schwach-sauren Reaktion mit  $n/2$  Acetatpuffer ( $p_h = 4,7$ ) haltbar gemacht werden. Durch Ausflockung mittels Essigsäure wird ein großer Teil des Fermentes mit dem ausfallenden Mucin mitgerissen und kann mittels der Zentrifuge abgetrennt werden. Der Bodensatz wird in  $n/40$  Ammoniak aufgelöst, mit Essigsäure neutralisiert und der Elektrodialyse unterworfen. Als Außenflüssigkeit dient  $n/100$  Essigsäure. Nach kurzer Zeit erfolgt eine reichliche Ausflockung, zum großen Teil an der Membran, in der die Lipase zum größten Teil enthalten ist. Der Niederschlag wird in  $n/40$  Ammoniak gelöst, neutralisiert, verdünnt und durch Kaolin adsorbiert, und zwar durch  $3\%$ , bezogen auf die Menge der Lösung. Die Elution wird mit glycerinhaltigem,  $2\frac{2}{3}\%$ -basischem Ammonphosphat vorgenommen. Weder am ammoniakalischen Auszug der frischen Schleimhaut des Hundemagens, noch an den reineren Lösungen wirken Calciumoleat mit Albumin aktivierend. Bei der Schweinemagenlipase wirkte Natriumoleat aktivierend. Gegen glykocholsaures Natrium verhalten sich die verschiedenen Präparate ungleich.

Zur Gewinnung der Darmlipase hat Hamsik<sup>1)</sup> die abgeschabte Schleimhaut mit Alkohol, Alkoholäther, schließlich mit Äther (zusammen höchstens 5 Stunden) behandelt, die auf dem Filter zurückbleibende Schleimhaut zwischen Filtrierpapier abgepreßt, dann bei Zimmertemperatur getrocknet, in einer Reibschale zerrieben und durchgesiebt. Das Präparat ist monatelang haltbar.

### Serumlipase<sup>2)</sup>.

Das Ferment wird bei fraktionierter Ausfällung der Globuline bei  $\frac{4}{10}$ — $\frac{6}{10}$  Ammonsulfatsättigung mit der Globulinfraktion mitgerissen und kann mit diesen Fraktionen mit Glycerin in Lösung gebracht werden. Beim Pferdeserum wird die Hauptmenge bei  $\frac{6}{10}$  Sättigung gewonnen, während beim Menschenserum zwischen  $\frac{4}{10}$  und  $\frac{6}{10}$  ein Unterschied nicht zu beobachten ist. Die Globulinniederschläge werden durch Zentrifugieren von der darüberstehenden Flüssigkeit möglichst gründlich befreit und dann in Glycerin aufgenommen (für  $30$ — $50$  cm<sup>3</sup> Serum  $5$ — $10$  cm<sup>3</sup> Glycerin).

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 59, S. 1. 1909.

<sup>2)</sup> Rona u. Petow: Biochem. Zeitschr. Bd. 146, S. 144. 1924.

### Ricinuslipase.

Darstellung: Der Komplex, in dem die Samenlipase enthalten ist, ist ein ganz anderer als der der tierischen Lipasen (Willstätter). Deshalb müssen auch die hier angewandten Reinigungsmethoden ganz andere sein<sup>1)</sup>.

Nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz bereitet man aus den geschälten Ricinusbohnen (*Ricinus sanguineus*) eine Sahne, indem man sie in der Reibschale zu einer zähen Paste verreibt und allmählich unter ständigem Reiben die 7fache Menge Wasser in kleinen Portionen von 5—10 cm<sup>3</sup> zufügt. Die gebildete Aufschwemmung wird 15 Min. bei etwa 3000 Umdr. zentrifugiert. Dabei bilden sich 3 Schichten, von denen die obere, die Sahne, abgeschöpft wird. Der Bodensatz, der noch einen Teil der Sahne enthält, wird derselben Behandlung noch einmal unterworfen. Die Sahne wird am besten im Faust-Heimschen Apparat in dünner Schicht mittels eines warmen Luftstromes auf  $\frac{2}{3}$  ihres Volumens eingedampft. Es hinterbleibt eine ölige Flüssigkeit, die fast die ganze in den Bohnen vorhandene Enzymmenge enthält. Man kann durch eine sehr schonende Ätherbehandlung des so vorgereinigten Enzympräparates noch die enzymatische Konzentration ohne erhebliche Verluste an Enzym steigern, indem man es unter einer geräumigen Glasglocke 36 Std. in einer Ätheratmosphäre läßt, dann mit 100 cm<sup>3</sup> Äther verdünnt und abschleudert. Das abgeschleuderte Enzym wird im Zentrifugen- glase noch 3 mal mit 30 cm<sup>3</sup> Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

Das  $p_h$ -Optimum im ungereinigten Zustande liegt zwischen 4,7—5,0 (Willstätter). Bei der Keimung verschiebt sich der Reaktionsbereich nach der alkalischen Seite hin ( $p_h = 6,8$ ). Die Wirkung wird durch Aktivatoren nicht beeinflusst.

### Bestimmungsmethoden.

Stalagmometrische Methode nach Rona und Michaelis<sup>2)</sup>.

Prinzip: Man bestimmt die verseifende Kraft eines Ferments an Estern als Substrat, die die Oberflächenspannung einer wässrigen Lösung stark herabsetzen, während ihre Spaltungsprodukte nicht oder kaum diese Eigenschaft zeigen. Die Größe

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 161 (205). 1924. (Vgl. hierzu auch die Unterscheidung von Blastolipase und Spermatolipase.)

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 31, S. 345. 1911 und Rona: Handb. der Biochem. Arbeitsmethoden S. 302. 1915.

der Oberflächenspannung wird mittels der Tropfmethode gemessen.

Erforderliche Lösungen. 1. Fermentlösung (Blut, Serum, Organextrakt, filtrierter Magensaft).

2. Gesättigte Tributyrinlösung. Man schüttelt 10 Tropfen Tributyrin mit 11 Wasser 1—2 Std. nicht zu heftig im Schüttelapparat und läßt 12—24 Std. stehen, Mischungen, die mehr als 2 Tage alt sind, sollen nicht angewandt werden. Den ungelösten Anteil läßt man absetzen und filtriert durch ein feuchtes Filter. Das klare Filtrat (die ersten Teile werden verworfen) wird in einen Tropftrichter gefüllt, damit man unabhängig von den an der Oberfläche sich ansammelnden ungelösten Tropfen durch das Trichterrohr die Lösung entnehmen kann.

3. Pufferlösung von geeignetem  $p_h$ .

Ausführung: Man eicht zunächst die Tropfpipette (Abb. 41) für Wasser bei 18°, dann für die gesättigte Tributyrin-Lösung und weiter für ihre Verdünnungen mit Wasser in Differenzen von 10 zu 10 % der gesättigten Lösung. Die so erhaltenen Tropfenwerte werden in ein Koordinatensystem eingetragen. Aus der erhaltenen Kurve kann man den Tributyringehalt einer Lösung (in Prozenten der gesättigten Lösung) aus der Tropfenzahl bestimmen [Abb. 42]. 1—2 cm<sup>3</sup> der Fermentlösung werden mit 50 cm<sup>3</sup> Mono- oder Tributyrinlösung unter Zusatz von 2 cm<sup>3</sup> des entsprechenden Puffers versetzt gründlichst durchgeschüttelt. Es wird sofort die Tropfenzahl dieses Gemisches bestimmt, indem man die Tropfpipette bis zur Marke aufsaugt (nicht mit dem Munde!) und die abfallenden Tropfen, die beim Ausfließen der Flüssigkeit zwischen den beiden Marken der Capillare gebildet werden, zählt. In bestimmten Zeitintervallen, so oft der Versuch es erfordert, wird die Tropfenzahl abermals bestimmt, und man wiederholt dies je nach Erfordernis. Statt die Tropfen direkt zu zählen, kann man sie auch auf einem mit Linoleum bespannten Brett auffangen, das man unter der Capillare langsam wegzieht (Abb. 44). — Aus der Eichkurve kann man den jeweilig noch vorhandenen Tributyringehalt ablesen.

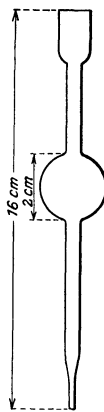


Abb. 41.

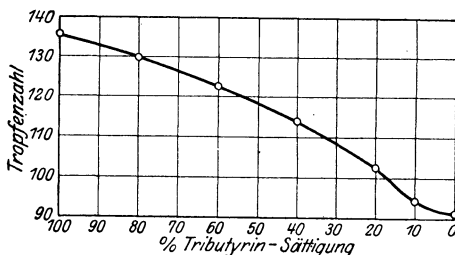


Abb. 42.

Beispiel: 50 cm<sup>3</sup> gesättigte wässrige Tributyrinlösung wurden mit 3 cm<sup>3</sup> Phosphatgemisch ( $\frac{1}{3}$  molar)<sup>1)</sup> verschiedener Zusammensetzung, dann mit 1 cm<sup>3</sup> (fünfmal) verdünntem Blutserum vom Kaninchen versetzt. Die Tabelle S. 99 zeigt gleichzeitig den Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Schnelligkeit der Spaltung.

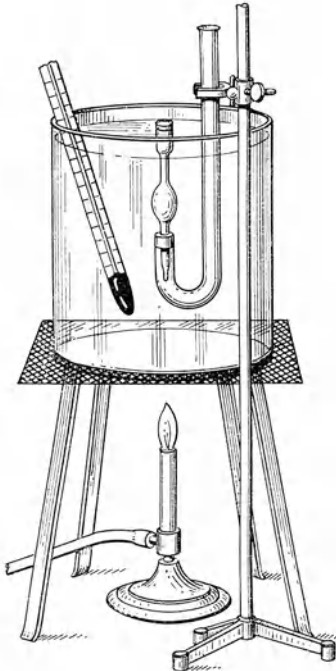


Abb. 43.

Bei stark alkalischer Reaktion, etwa von  $p_h = 9$  an, müssen bei jeder entsprechenden Reaktion Kontrollversuche mit aufgekochtem bzw. mit FN<sub>a</sub> versetztem Blut bzw. Serum angesetzt werden. Will man nicht bei Zimmer-, sondern höherer Temperatur arbeiten, so ist eine aus der Abb. 43 ersichtliche Anordnung zu empfehlen.

<sup>1)</sup> Zur Darstellung des  $\frac{1}{3}$ -m-primären Phosphates versetzt man 100 cm<sup>3</sup> 1 mol. (dreifach normale) Phosphorsäure mit 100 cm<sup>3</sup> n-NaOH und 100 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser. Zur Darstellung des  $\frac{1}{3}$ -m-sekundären Phosphates werden 100 cm<sup>3</sup> 1 mol. Phosphorsäure mit 200 cm<sup>3</sup> n-NaOH versetzt.

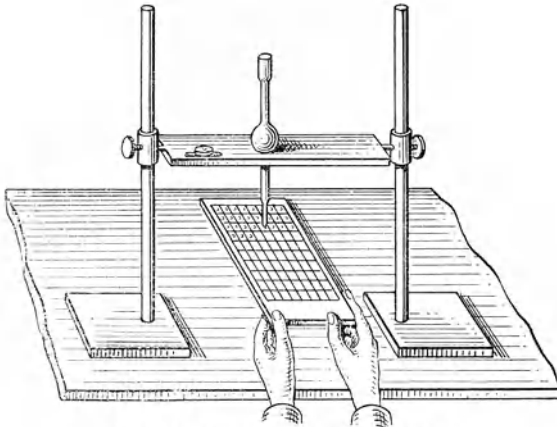


Abb. 44. (Anordnung nach Dr. Bien.)

Regulatorgemisch	[H]	$p_h$ elektrometrisch gemessen	Tropfenzahl nach Minuten				Vorhandenes Tributyrin in Prozenten nach Minuten			
			0	12	24	48	0	12	24	48
			1 prim. Phosphat: 10 sek. Phosphat . .	$1,30 \cdot 10^{-8}$	7,90	146	138	130	118	100
1 " " : 1 " " . . . . .	$1,90 \cdot 10^{-7}$	6,72	146	140	134	123	100	89	75	50
5 " " : 1 " " . . . . .	$8,30 \cdot 10^{-7}$	6,08	146	141	136	127	100	91	80	58
Kontrollversuch mit aufgekocht. Serum:										
1 prim. Phosphat: 10 sek. Phosphat .	$1,00 \cdot 10^{-8}$	8,00	146	146	146	146	100	100	100	100
1 prim. Phosphat: 100 sek. Phosphat .	$1,40 \cdot 10^{-8}$	7,85	146	129	120	113	100	63	45	31
5 " " : 1 " " . . . . .	$7,13 \cdot 10^{-7}$	6,14	146	134	128	118	100	76	62	40
50 " " : 1 " " . . . . .	$4,50 \cdot 10^{-6}$	5,35	146	137	133	127	100	77	73	58
Kontrollversuch mit aufgekocht. Serum:										
1 prim. Phosphat: 200 sek. Phosphat .	$9,20 \cdot 10^{-9}$	8,04	146	446	146	146	100	100	100	100
Sekundäres Phosphat . . . . .	$1,70 \cdot 10^{-8}$	7,76	146	130	116	—	100	66	36	—
5 prim. Phosphat: 2,5 sek. Phosphat . .	$3,55 \cdot 10^{-7}$	6,45	146	136	126	116	100	80	57	36
6 " " : 1,0 " " . . . . .	$1,20 \cdot 10^{-6}$	5,92	146	139	132	119	100	86	70	42
6 " " : 1,0 " " . . . . .	$2,30 \cdot 10^{-6}$	5,65	146	139	132	120	100	86	70	44
10 " " : 0,7 " " . . . . .	$3,10 \cdot 10^{-6}$	5,53	146	140	134	123	100	89	75	51
10 " " : 0,1 " " . . . . .	$1,40 \cdot 10^{-5}$	4,85	146	143	139	132	100	95	86	70
* Primäres Phosphat . . . . .	$2,59 \cdot 10^{-5}$	4,59	146	144	142	138	100	97	93	85
Kontrollversuch mit aufgekocht. Serum:										
10 sek. Phosphat: $1,5 \cdot 10^{-10}$ -NaOH . . . .	$1,29 \cdot 10^{-8}$	7,93	146	146	146	145	100	100	100	98

Modifikation der Methode nach Willstätter und Memmen<sup>1)</sup>.

Prinzip: Es wird, wie bei der ursprünglichen Methode, bei stark verdünntem Ferment (im Serum und im Magensaft) die Tributyrinhydrolyse stalagmometrisch verfolgt (bei  $p_h = 8,6$ ), aber unter ausgleichender Aktivierung, mittels Albumin, Na-Oleat und Calciumchlorid<sup>2)</sup>.

Erforderliche Lösungen: 1. Fermentlösung. 2. Tributyrinlösung aus gereinigtem Präparat (das Tributyrin des Handels ist nicht rein). Ein Tributyrin ist rein, wenn man aus einer größeren Menge (5—10 g) beim Schütteln mit 200 cm<sup>3</sup> Wasser eine Lösung von derselben Tropfenzahl bekommt, wie aus 3 Tropfen Tributyrin. 3. Eialbumin. 4. 2 proz. CaCl<sub>2</sub>-Lösung. 5. 2 proz. Na-Oleatlösung. 6. Pufferlösung: 1 Teil 2,5-n-NH<sub>3</sub> + 8 Teile 2,5-n-NH<sub>4</sub>Cl,  $p_h = 8,6$  bei 18°.

Ausführung: Die durch Vorversuche ermittelte geeignete Enzymmenge wird mit der Lösung von 30 mg Eialbumin (gewöhnlich 0,5—1 cm<sup>3</sup>), mit 0,5 cm<sup>3</sup> 2 proz. CaCl<sub>2</sub>-Lösung (10 mg), 56 cm<sup>3</sup> Tributyrinlösung aus gereinigtem Präparat und dann sofort mit 2 cm<sup>3</sup> Puffer, sowie 0,5 cm<sup>3</sup> Na-Oleatlösung versetzt, so daß das Gesamtvolumen 60 cm<sup>3</sup> beträgt. Darauf wird die Anfangstropfenzahl gemessen und bei einer Temperatur von 20° die Abnahme in Abständen von 20 Min. 3—4 mal bestimmt. Ist es nötig, größere Mengen verdünnter, wässriger Lösungen zu analysieren, so kann man an Albumin und der CaCl<sub>2</sub>-Lösung etwas Volumen einsparen.

Als Einheit der Lipase für die Spaltung des Tributyrins wird diejenige Menge definiert, die unter den bestimmten Bedingungen eine Abnahme der Tropfenzahl in 50 Min. um 20 bewirkt, das ist etwa die Hälfte der Differenz zwischen den Tropfenzahlen von reiner Tributyrinlösung und Wasser (Butyraseinheit). Die Proportionalität zwischen Reaktionszeit und Enzymmenge hat genaue Geltung<sup>3)</sup>.

#### Titrimetische Methoden.

Nach Willstätter<sup>4)</sup> mit ausgleichender Aktivierung.

Prinzip: Die Lipasewirkung ist nicht nur von der Wasser-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 129, S. 1. 1923.

<sup>2)</sup> Es sei daran erinnert (S. 94), daß die Leberlipase (besser Leberesterase) im Gegensatz zur Pankreaslipase durch diese Zusätze nicht aktiviert, sondern gehemmt wird.

<sup>3)</sup> Über Lipase-Einheit vgl. ferner Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 115. 1923; Bd. 129, S. 23. 1913; Bd. 133, S. 237. 1924; Bd. 138, S. 226. 1924.

<sup>4)</sup> Willstätter, R., E. Waldschmidt-Leitz, Fr. Memmen: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 93 (S. 111). 1922.

stoffionenkonzentration abhängig, sondern auch von den Begleitstoffen des Fermentes, die teils fördernd, teils hemmend wirken (siehe oben). Um nun gut vergleichbare Resultate bei verschiedenem Reinheitsgrad und verschiedener Herkunft der Lipase zu bekommen, wird das Enzym durch geeignete Zusätze maximal aktiviert oder gehemmt. Als solche dienen Albumin und Calciumchlorid, Albumin und glykocholsaures Natrium, Albumin und Calciumchlorid und gallensaures Salz. Als Substrat dient Olivenöl. Die entstandene Säure wird mittels alkoholischer Kalilauge titriert.

Willstätter wendet 3 Bestimmungsweisen an:

1. Die meist angewandte Methode mit wechselndem  $p_h$ , beginnend im alkalischen und endend im sauren Gebiet unter Aktivierung mittels Calciumchlorid und Albumin.

2. Im alkalischen Medium ( $p_h = 8,9$ ) unter Aktivierung mittels Albumin und Calciumchlorid. Die entstehende Fettsäure erfordert eine größere Puffermenge, die reinere Präparate schädigt. Daher kann sie bei reineren Präparaten nicht angewandt werden.

3. In konstant saurem Gebiet ( $p_h = 4,7$ ) unter ausgleichender Hemmung mittels Albumin.

Ausführung zu 1: Man bringt das Enzymmaterial mit Wasser auf  $10 \text{ cm}^3$  in eine weithalsige Flasche von  $30 \text{ cm}^3$  Inhalt. Dann gibt man  $2,5 \text{ g}$  Olivenöl (Verseifungszahl 185,5) und  $2 \text{ cm}^3$  Pufferlösung ( $n\text{-NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$  im Verhältnis 1 : 2 also  $0,66 \text{ cm}^3 n\text{-NH}_3 + 1,34 \text{ cm}^3 n\text{-NH}_4\text{Cl}$ ,  $p_h = 8,9$  bei  $30^\circ$ ) und  $0,5 \text{ cm}^3$  2 proz. Calciumchloridlösung und nach kurzem Durchschütteln  $0,5 \text{ cm}^3$  3 proz. Albuminlösung hinzu. Die Mischung wird regelmäßig und kräftig 3 Min. mit der Hand geschüttelt. Danach kommt die Emulsion bei  $30^\circ$  in den Thermostaten (wobei zu bemerken ist, daß die Emulsionsform selbst nicht etwa das Bedingende für die Spaltung ist und überhaupt die Emulsion nur von geringer Bedeutung für die lipolytische Wirkung ist). Die Bestimmung soll so eingerichtet werden, daß die Hydrolyse zwischen 10 und  $24\%$  fällt. Überschreitet die Spaltung  $24\%$ , so soll sie mit der halben Enzymmenge wiederholt werden. Die Reaktion durchschreitet nach  $8,5\%$  Spaltung den Neutralpunkt. Bei  $24\%$  Spaltung, dem Endpunkt der Spaltung, ist  $p_h = 5,5$ .

Zur Titration der entstandenen Säure wird der Flascheninhalt mit 96 proz. Alkohol in einen Erlenmeyerkolben gespült, so daß das Volumen der alkoholischen Flüssigkeit  $125 \text{ cm}^3$  beträgt. Die Öltropfen, die noch an der Oberfläche schwimmen, löst man auf, indem man noch  $20 \text{ cm}^3$  Äther zusetzt. Die Wirkung der Lipase



wird hierdurch sistiert. (In nur alkoholischem Medium schreitet die Fermentwirkung noch langsam fort.) Als Indicator dienen 12 Tropfen 1 proz. alkoholischer Lösung von Thymolphthalein, es wird mit  $n/10$ — $n/1$  alkoholischer Kalilauge bis zu einem deutlich blauen Farbton titriert. Dabei werden außer der gebildeten Fettsäure auch die Salzsäure des Ammonchlorids und die amphotere Substanz der Proteingruppe aus der Drüsensubstanz mit-titriert. Der hierfür abzuziehende Alkaliverbrauch wird in einer entsprechenden Kontrolle ermittelt.

Als Lipaseeinheit (L. E.) wird die Menge Lipase bezeichnet, die unter den oben charakterisierten Bedingungen (im Volumen von  $13 \text{ cm}^3$ , enthaltend  $2 \text{ cm}^3 \text{ NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$  Puffer von  $p_h = 8,9$ , unter Aktivierung mit  $10 \text{ mg CaCl}_2$  und  $15 \text{ mg Albumin}$ ) bei  $30^\circ$  in 1 Std.  $24\%$  von  $2,5 \text{ g}$  Olivenöl (mit einer Verseifungszahl von  $185,5$ ) spaltet. Das Maß für die Konzentration der Lipase ist der Lipasewert (L. W.), d. h. die Anzahl der Lipaseeinheiten in 1 Zentigramm der Substanz.

Ausführung zu 2. Zur Fettspaltung bei alkalischer konstanter Reaktion bedarf es großer Puffermengen. Das Enzym wird mit Wasser auf  $10 \text{ cm}^3$  gebracht und mit  $2,5 \text{ g}$  Olivenöl versetzt. Es wird mit  $5 \text{ cm}^3$  des aus ( $1,67 \text{ cm}^3$ )  $5 \text{ n-NH}_3$  und ( $3,33 \text{ cm}^3$ )  $5 \text{ n-NH}_4\text{Cl}$  zusammengesetzten Puffers gemischt. Dazu kommen  $10 \text{ mg CaCl}_2$ ,  $15 \text{ mg Albumin}$ , je  $0,5 \text{ cm}^3$  Wasser, so daß die wässrige Flüssigkeit  $16 \text{ cm}^3$  beträgt. Die weitere Ausführung gestaltet sich wie unter 1. beschrieben. Nur ist wegen der großen Puffermenge stärkere Lauge ( $1,5\text{-n-alkohol. KOH}$ ) erforderlich.

Ausführung zu 3. Das Enzym wird wieder auf  $10 \text{ cm}^3$  verdünnt und dazu Pufferlösung ( $2,00 \text{ cm}^3$  aus gleichen Teilen  $n/2$ -Essigsäure und  $n/2$ -Na-Acetat,  $p_h = 4,7$ ) gegeben. Als Substrat dient wieder  $2,5 \text{ g}$  Olivenöl (Verseifungszahl  $185,5$ ) mit  $15 \text{ mg Albumin}$ . Es wird  $3 \text{ Min.}$  lang geschüttelt. Die Ausführung gestaltet sich weiter wie unter 1. angegeben. Titriert wird mit  $0,1\text{-n-alkoholischer KOH}$ .

Das Albumin wirkt bei saurer Reaktion hemmend;  $\text{CaCl}_2$  ist ohne Wirkung.

#### Bestimmungsmethode nach Knäffl-Lenz<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die Verseifung von Estern wird gemessen durch die verbrauchte Laugenmenge, die notwendig ist, um die durch einen entsprechenden Indicator gekennzeichnete  $[\text{H}^+]$  konstant zu erhalten.

<sup>1)</sup> Knäffl-Lenz: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 97, S. 242. 1923.

Ausführung: In einen großen Wasserthermostaten, der die Temperatur auf  $0,1^{\circ}$  konstant hält, wird eine Reihe von ausgedämpften zylindrischen Hartglasröhren von  $200\text{ cm}^3$  Inhalt, deren Hals auf  $1\text{ cm}^3$  verengt ist, mit Hilfe einer vertikal verschiebbaren Aufhängevorrichtung eingesenkt. Oberhalb der Röhre werden capillar ausgezogene Mikrobüretten (Teilung  $0,01\text{ cm}^3$ ) angebracht. Durch Heben der Aufhängevorrichtung können die Röhren so weit aus dem Thermostaten gezogen werden, daß die capillaren Enden in die Hälse der Röhren ragen und die Farbänderungen der mit Indicatoren versetzten Esterlösungen während der Titration beobachtet werden können. Behufs rascher und gründlicher Durchmischung der Esterlösungen befinden sich Glasspiralen in den Röhren, die mit Hilfe eines Seidenfadens auf und ab gezogen werden können. Sie dienen auch dazu, um den an den Capillaren hängenden Tropfen abzuziehen. Die Röhren werden gewöhnlich mit je  $100\text{ cm}^3$  Ester (Äthylbutyrat, Propylpropionat, Mono- und Tributyrin) und einer entsprechenden Menge folgender Indicatoren versetzt: Thymolblau, Kresolrot, Phenolphthalein, Kresolpurpur, Methylrot, Bromphenolblau, und die Wasserstoffionenkonzentration einer bestimmten Farbennuance auf elektrometrischem Wege bestimmt. Wenn die Lösungen die Temperatur des Thermostaten angenommen haben, erfolgt der Zusatz der Lipaselösung (gewöhnlich  $0,5\text{—}1\text{ cm}^3$ ). Sobald durch die bei der Verseifung freigewordene Säure die Farbennuance des Indicators sich ändert, werden die Röhren zur Titration bis zur Hälfte aus dem Thermostaten gezogen und soviel carbonatfreie NaOH zugelassen, bis die ursprüngliche Farbe wieder hergestellt ist; gleichzeitig wird die Zahl der verbrauchten Kubikzentimeter und die Zeit notiert. Da die Röhren nur während der Titration offen sind, wird eine nennenswerte Verdampfung des Esters auch bei langdauernden Versuchen vermieden. Die Natronlauge ist meistens  $0,5$  oder  $0,25\text{ n}$ . Die Indicatormenge beträgt  $1\text{ cm}^3$ . Die Versuchstemperatur beträgt meistens  $30^{\circ}$ .

In Anlehnung an die Arbeit von Knaffl-Lenz verfolgen Rona und Ammon die Wirkung verschiedener Lipasen durch elektrometrische Titration.

Die Anfangswasserstoffionenkonzentration ist die der Neutralität (bei  $18^{\circ}$ :  $p_{\text{H}} = 7,07$ ; bei  $37^{\circ}$ :  $p_{\text{H}} = 6,76$ ), auf die die Fermentlösung vor Zusatz des Esters gebracht war.

Die Versuche werden in einem geräumigen Wasserbade (siehe Abb. 45), das durch einen Thermostaten ständig auf  $37^{\circ}$  gehalten wird, ausgeführt. Auf einer Brücke, die in das Bad etwa  $10\text{ cm}$  tief eingesetzt ist, steht eine innen und außen paraffinierte, mit

gesättigter Kaliumchloridlösung gefüllte, 11 cm hohe Glaswanne, in die das Abflußrohr der gesättigten Kalomelektrode (Anode) taucht, so daß die Elektrode selbst noch etwa zu  $\frac{1}{3}$  im Wasserbade ist. Auf der Brücke steht ferner ein dickwandiges, etwa 120 cm<sup>3</sup> fassendes und 12 cm hohes Standglas, das mit der Versuchslösung gefüllt ist. In diese Flüssigkeit wird 0,5 cm tief eine Glockenelektrode (Kathode) eingesetzt. Durch

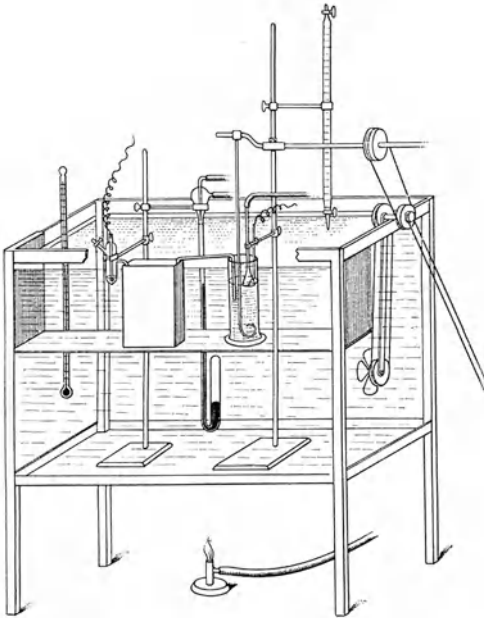


Abb 45.

einen Agarheber von dem Standglase zum KCl-Bade beide Elektroden miteinander verbunden. Die Ableitungsdrähte der Elektroden gehen entweder an die Gasketten-Apparatur nach L. Michaelis mit dem Capillarelektrometer oder zweckmäßiger, da es einfacher zu bedienen ist, an das Potentiometer nach E. Mislowitzer. Um eine gute Durchmischung der Untersuchungsflüssigkeit zu gewährleisten, ist noch ein Rührer angebracht, der durch eine besondere Konstruktion mit dem Rührwerk des Wasser-

bades in Verbindung gesetzt ist. Durch die Glockenelektrode geht beständig Wasserstoffgas, um jederzeit während der Versuchsdauer  $p_H$ -Messungen ausführen zu können. Neuerdings werden kleinere Standgefäße mit kleinen Glockenelektroden benutzt, so daß gleichzeitig zwei Versuche in Gang gehalten werden können.

Beispiel: In das Standglas, das sich in dem auf 37° angeheizten Wasserbade befindet, werden 4 cm<sup>3</sup> Schweine-Leber-Preßsaft und 96 cm<sup>3</sup> Wasser gefüllt. Nach einer halben Stunde wird die Glockenelektrode eingesetzt und 10—15 Minuten Wasserstoffgas durchgeleitet. Jetzt hat die Lösung die Wasserbadtemperatur angenommen, und die platinierte Platinelektrode hat sich

mit Wasserstoff beladen. Durch einen Agarheber wird der Stromkreis geschlossen, der Wasserstoffstrom wird unterbrochen, so, daß die Spitze des Platindrahtes gerade noch eintaucht und der Rührer auf Leerlauf gestellt. Es werden z. B. 595 Millivolt, folglich  $p_h = 5,85$  gemessen. Durch tropfenweise Zugabe von  $1/10$ -n-NaOH unter Wasserstoff-Einleiten und Rühren wird die Lösung allmählich neutraler, bis der Neutralitäts- $p_h$  (651 Millivolt;  $p_h = 6,76$ ) erreicht ist. Zuder so neutralen Lösung werden 0,2827 g eines Esters (Mandelsäuremethylester), in 1 cm<sup>3</sup> Toluol gelöst, gefügt. Nachdem durch stärkeres Rühren und Durchleiten von Wasserstoffgas das Toluol entfernt ist (10—20 Min.; der Ester blieb danach in Lösung), wird der  $p_h$  auf einem konstanten Wert gehalten. Es wird durch Zufügen von  $1/10$ -n-NaOH das Potential zwischen den Elektroden stets auf ca. 651 Millivolt gebracht. So sind im Laufe 1 St. 3,4 cm<sup>3</sup>, nach 2 Std., nachdem die Lösung genau auf den  $p_h$  6,76 gebracht worden ist und der Versuch abgebrochen wurde, insgesamt 7,2 cm<sup>3</sup> n/10-NaOH verbraucht worden. Die 7,2 cm<sup>3</sup>  $1/10$ -n-NaOH entsprechen 0,1094 Mandelsäure oder 0,1195 g Mandelsäuremethylester; 42,27% des Esters sind also verseift worden. Dieser Wert ist etwas zu hoch, es muß noch die Eigenverseifung des Esters berücksichtigt werden, die in einem Kontrollversuche unter sonst gleichen Bedingungen, nur mit gekochter Fermentlösung, bestimmt wird.

#### Bestimmung der Ricinuslipase nach Willstätter-Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup>.

In ein kleines zylindrisches Standfläschchen von 15—20 cm<sup>3</sup> Inhalt wird das zu untersuchende Enzympräparat eingewogen (und zwar in der Regel die 1,0 g rohem, ungeschältem Samen entsprechende Menge, und mit 2,50 g Öl (meist Olivenöl) vermischt. Zu der auf 20° gehaltenen Mischung werden alsdann 2,00 cm<sup>3</sup> 0,5-n-Acetatpufferlösung von  $p_h$  4,7 (bestehend aus 1,00 cm<sup>3</sup> 0,5-n-Essigsäure + 1,00 cm<sup>3</sup> 0,5-n-Ammonacetat) zugegeben, worauf das Fläschchen 3 Minuten lang kräftig mit der Hand geschüttelt wird, dann läßt man es noch 17 Minuten im Thermostaten von 20° stehen. Die Fermentwirkung wird durch Zusatz von 30 cm<sup>3</sup> 96prozentigem Alkohol unterbrochen und die gebildete Fettsäure nach Zusatz von 15 cm<sup>3</sup> Äther mit n-KOH und Phenolphthalein als Indicator titriert. Bei Spaltung des alkohollöslichen Ricinöls erübrigt sich der Zusatz von Äther. Da sowohl der angewandte Puffer wie die amphotere Substanz der Enzympräparate in alkoholischer Lösung einen Ei-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chemie Bd. 134. S. 161. 1924.

genverbrauch an Lauge aufweisen, muß dieser Betrag in einer Leerbestimmung ermittelt werden.

Als Maß für die Ricinuslipase ist die Phytolipase-Einheit (Ph-L-E) gewählt, d. i. diejenige Enzymmenge, die unter den genannten Bedingungen (bei  $20^{\circ}$ ,  $p_h$  4,7) 2,50 g Olivenöl (Verseifungszahl 185,5) in 20 Minuten  $7,5\%$  spaltet.

Gasanalytische Bestimmung nach Rona und Lasnitzki<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die Methode erlaubt, sehr geringe Lipasemengen zu bestimmen und das Ferment im überlebenden Gewebe nachzuweisen.

In Anlehnung an die Warburgsche Methode des Glykolyse nachweises (vgl. S. 198) wird die bei der Verseifung von Estern (Tributyryn) gebildete Säure (Buttersäure) dadurch gemessen, daß man das Volumen einer durch die Buttersäure aus einer Bicarbonatlösung

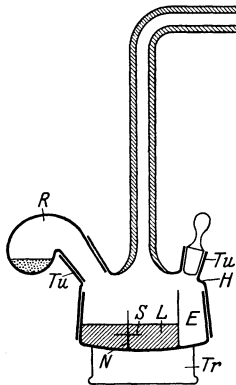


Abb. 46. *Tr* Trog, *L* Ringerlösung oder Serumverdünnung, *N* Glasnadel, *S* Gewebsschnitt, *E* Einsatz für Atmungsversuche, *H* Helm des Manometers, *Tu* Tubus, *R* Retorte.

ausgetriebenen äquivalenten Menge  $\text{CO}_2$  manometrisch bestimmt.

Apparatur: Zur Messung der  $\text{CO}_2$  dienen Barcroft'sche Blutgasmanometer, die auf einer Schüttelvorrichtung montiert sind (Tourenzahl 60—120 pro Minute). Als Reaktionsgefäße dienen Glasröge von ca.  $10 \text{ cm}^3$  Inhalt, an deren Boden Glasnadeln eingeschmolzen sind (Abb. 46). Ein kleinerer abgetrennter Glasraum dient zur Aufnahme eventueller Absorptionsflüssigkeit (für Atmungsversuche). Der Glasrog wird mittels eines Schliffes an dem Helm des Manometers befestigt. Der Helm trägt zwei Tuben, eine, die zur Aufnahme einer kleinen Glasretorte mit der Tributyrinlösung dient, und eine mit einem Glasstopfen verschlossene zur Durchleitung von Kohlenensäure. Sehr gut bewährt hat sich die von

Dr. Nicolai angegebene Form (Abb. 47) des Reaktionsgefäßes. Als Manometersperrflüssigkeit dient die Brodiesche Flüssigkeit. Sie besteht aus  $500 \text{ cm}^3$  Wasser, 23 g NaCl, 5 g gallensaurem Natrium und ist zur Abhaltung von Bakterien mit soviel alkoholischer

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 504. 1924.

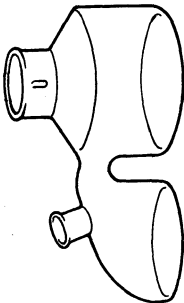


Abb. 47.

Thymollösung versetzt, daß sie deutlich nach Thymol riecht. Die Manometer enden unten in einem Gummischlauch mit Druckschraube.

Die von O. Warburg inaugurierte Methode, die Leistung eines Ferments gasvolumetrisch zu bestimmen, ist von besonderer Genauigkeit und erlaubt, das Entstehen oder Verschwinden eines Gases je nach der Größe des Gefäßvolumens und der Menge der eingefüllten Flüssigkeit mit einem Fehler von  $\pm 0,5$  bis  $\pm 0,05 \text{ cm}^3$  festzustellen. Umgerechnet auf Massen entsprechen diese Fehler einer Größenordnung von  $10^{-6}$  bis  $10^{-8}$  Gramm je nach der Natur des Gases. Diese außerordentliche Empfindlichkeit der Methode bedingt eine ebenso große Sorgfalt bei der Behandlung der Apparatur, der Vorbereitung der Versuche und der Ausschaltung bzw. äußersten Verminderung aller nur möglichen Fehler<sup>1)</sup>.

Für die praktische Arbeit seien im folgenden eine Reihe von Ratschlägen gegeben, bei deren sorgfältiger Beobachtung die Fehler im allgemeinen unter 1% gehalten werden können.

#### Die Eichung der Gefäße.

Die Gefäße mit Stopfen werden einen Tag lang mit Kaliumbichromat-Schwefelsäure gereinigt, mit Leitungswasser und danach mit destilliertem Wasser gut gespült und im Trockenschrank bei  $100^\circ \text{C}$  getrocknet. In den Schlauchansatz am unteren Ende des Barometers wird durch den oben offenen linken Barometerschenkel unter mehrfachem Vor- und Zurückdrehen des Schlauchquetschers Brodie-Lösung eingefüllt, deren spezifisches Gewicht so beschaffen ist, daß 10000 mm Flüssigkeitssäule 760 mm Hg entsprechen. Vor der Eichung überzeugt man sich, daß beim Hochdrücken der Flüssigkeit in die Capillaren keine Luftblasen in die Capillaren hineingelangen und auch die beiden Menisken blasenfrei sind.

Die getrockneten Gefäße werden an ihren Schliffflächen mäßig eingefettet, mit Gummischnüren oder kräftigen Spiralfedern an den Conus oder die Haube des Barometers angesetzt und mit den Stopfen fest verschlossen. Man vermeide Fette, welche organische Bestandteile enthalten, wie *Adeps suillus*, *Adeps lanae*, *Sebum ovile* usw., weil diese bei Lipasearbeiten Fehler hervorrufen; auch vermeide man, daß beim Hineindreihen der Schliffe Fett in das Innere der Gefäße gelangt.

Die konischen Stopfen und Retorten sind sehr fest, unter Anwendung von leichter Gewalt einzusetzen, bis die Drehbewegung durch engste Annäherung der beiden Glasflächen erschwert ist. Bei Nichtbeachtung dieser Vorschrift

<sup>1)</sup> Vgl. hierzu eine demnächst erscheinende Arbeit von Rona und Nicolai.

ergeben sich bei der Eichung oder bei späteren Versuchen ansehnliche scheinbare Volumenveränderungen des Gefäßes. Es ist überhaupt zweckmäßig, bei Fermentarbeiten, bei denen erst im Verlauf des Versuchs ein Substrat oder ein Gift hinzugefügt werden soll, Gefäße, wie Abb. 48<sup>1)</sup> oder Abb. 47 zu benutzen, da in manchen Fällen beim Umdrehen einer besonders ungünstigen Retorte eine scheinbare Gasbildung bis zu 30 mm<sup>3</sup> vorgetauscht wird.

Die Eichung des Gefäßes hat den Zweck, das Volumen des Gefäßes zu ermitteln. Der Eichung liegt folgendes Prinzip zugrunde: Komprimiert man ein unbekanntes Volumen  $v_1$ , das unter dem Atmosphärendruck  $p$  steht, auf ein kleineres, ebenfalls unbekanntes Volumen  $v_0$ , so wächst der Druck um  $h_1$ , und es besteht die Beziehung

$$v_1 \cdot p = v_0 (p + h_1). \quad (1)$$

Verkleinert man das unbekannte Volumen  $v_1$  um die bekannte Größe  $a$ , indem man eine bestimmte Menge Flüssigkeit einfüllt, und komprimiert wieder bis zum gleichen Punkt, so besteht die Beziehung

$$(v_1 - a) \cdot p = (v_0 - a) (p + h_2). \quad (2)$$

$h_2$  ist größer als  $h_1$ , da  $v_0 - a$  kleiner ist als  $v_0$ . Durch Subtraktion der Gleichung (1) und (2) ergibt sich:

$$v_0 = a \frac{h_2}{h_2 - h_1}. \quad (3)$$

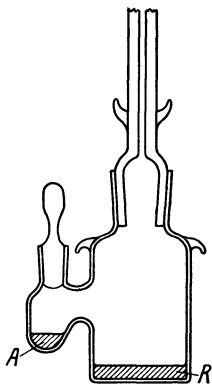


Abb. 48.

Das Volumen des Gefäßes wird ermittelt durch eine abgemessene Menge Flüssigkeit und zwei Barometerablesungen.

Die Eichung wird ausgeführt, indem die vorbereiteten Apparate in das Wasserbad eingesetzt und bei geöffneten Hähnen die Menisken ganz herunter bis unter den Anfang der Teilung gedreht werden. Um die Einflüsse der Temperatur- und der Druckveränderung auszuschalten, halte man das Wasserbad bei Zimmertemperatur einigermaßen konstant und beobachte häufiger das Barometer. Schwankungen von 10 mm Hg während der Dauer einer Eichung bedingen noch keine wesentlichen Fehler.

Vor Beginn der Eichung und vor jeder neuen Einstellung warte man mindestens  $\frac{1}{2}$ , am besten eine Stunde bei völlig heruntergedrehten Menisken, bis die Capillaren abgelaufen sind, stelle dann durch vorsichtiges Anschrauben den rechten Meniscus mit seinem unteren Rand auf den Anfangsteil der Skala (0,0)

<sup>1)</sup> Nach O. Warburg, K. Posener und E. Negelein: Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 316. 1924.

unter sorgfältiger Vermeidung von Parallaxenfehlern durch Spiegelablesung ein und schließe den Hahn. Beim Drehen der Schraube unten steigen beide Schenkel mit verschiedener Geschwindigkeit empor. Man kann dabei beobachten, daß der linke Schenkel sich nicht sofort in eine Ruhelage einstellt, wenn man mit Drehen aufhört. Der Grund hierfür ist einmal eine leichte Verzögerung des Gasaustausches durch die Capillare, was ohne Einfluß auf die Eichung bleibt, ferner bei Anwesenheit von Wasser im Gefäß eine verzögerte Einstellung des Gleichgewichts

Partialdruck des Gases im Gasraum  
Partiallösungsdruck in der Flüssigkeit

Diese Verzögerung ist selbst bei sorgfältigstem Arbeiten immer der Grund für Unstimmigkeiten bei der Ermittlung von  $h_2$ , wenn das Volumen  $a$  in Form von Wasser eingefüllt wird. Die Schwankungen können bei manchen Gefäßen bis zu 20 mm betragen und stehen offensichtlich zu der Menge des eingefüllten Wassers in Beziehung. Man vermeidet sie völlig, wenn man  $h_1$  und  $h_2$  in völlig trockenen Gefäßen bestimmt und das Volumen  $a$  als Quecksilber einfüllt, auswiegt, und unter Reduktion des spezifischen Gewichts des Hg auf  $0^\circ$  sein Volumen errechnet, was zugleich den Vorteil einer genaueren Bestimmung von  $a$  hat.

Es gelingt mit dieser Methode,  $h_1$  und  $h_2$  in mehrfach aufeinander folgenden Ablesungen immer wieder auf 0 bis höchstens 1,0 mm genau, also mit einem wahrscheinlichen Fehler von  $\pm 0,5$  mm zu bestimmen.

Jeder Fehler von  $h_2$  überträgt sich auf die Berechnung von  $v$ . Die Größe dieses Einflusses hängt ab von dem Verhältnis  $a:v$ , d. h. von der relativen Füllung des Gefäßes mit Hg bei der Ermittlung von  $h_2$ . Bei einem gleich großen Fehler von  $a$  kann man noch ein Volumen  $v$  mit einem Fehler von weniger als einem Prozent bestimmen bei relativ großem  $a$ ; bei geringer Füllung ( $a = \frac{v}{4}$ ) wird sich ein Fehler von über 10% (!) bei der Errechnung von  $v$  ergeben.

Bei einem Fehler von  $\pm 5$  mm für  $h_2$  wird  $v$  mit einem Fehler von höchstens  $\pm 1\%$  bestimmt bei  $a = \frac{3}{4}v$ ; bei  $a = \frac{1}{2}v$  steigt der Fehler für  $v$  auf  $-2,5$  bzw.  $+2,9\%$ , bei  $a = \frac{1}{4}v$  auf  $-9,5$  bzw.  $+10,2\%$ .

Wenn nun auch die Minimumsbedingung für den Fehler ein möglichst großer Wert  $\frac{a}{v}$  ist, so wird auf der anderen Seite bei



wachsendem  $a$  die Größe  $h_1$  immer kleiner, da  $h_2$  bei der begrenzten Länge des Barometerschenkels nicht über einen begrenzten Wert hinauswachsen kann. Die Größe  $h_1$  darf aber nicht unter 4—5 cm sinken, damit die bei der Ablesung dieser Größe entstehenden wahrscheinlichen Beobachtungsfehler bestimmt unter  $1\frac{0}{10}$ , also unter 0,4—0,5 mm bleiben.

In praxi geht man so vor, daß man zuerst den Wert von  $h_2$  bestimmt und dabei soviel Hg in das Gefäß einfüllt, daß nur noch insgesamt ca. 1—1,5 cm<sup>3</sup> Gasraum übrig bleibt. Bei kleineren Gefäßen (unter 10 cm) wird man zur Bestimmung von  $h_1$  vollständig entleeren können, bei größeren läßt man ein neues, kleineres Volumen Hg zurück, dessen Größe sich leicht errechnen läßt.

$h_2$  sei z. B. als 24,75 cm ermittelt worden.  $h_1$  soll nicht unter ca. 4—5 cm sinken. Aus Gleichung (3) ergibt sich die Beziehung

$$\frac{h_2}{h_1} = \frac{v}{v-a} = \frac{24,75}{4 \text{ bis } 5} = \text{ca. } 5,5.$$

In dem Gefäß befanden sich bei der Bestimmung von  $h_2$  138,04 g Hg bei einer Temperatur von 19,3° C = 10,19 cm<sup>3</sup>. Damit  $h_1$  nicht kleiner als 4—5 cm,  $\frac{h_2}{h_1}$  also ca. 5,5 wird, darf nicht alles Hg entfernt werden, sondern nur soviel, daß  $\frac{v}{v-a} = \text{ca. } 5,5$  wird (wobei  $v$  nicht das eigentliche Gefäßvolumen, sondern ein Hilfsvolumen darstellt).

$\frac{a}{v} = \frac{4,5}{5,5}$ , d. h. die zu entfernende Menge Hg ist unter der Annahme, daß bei der Bestimmung von  $h_2$  nur ein Gasraum von 1 cm<sup>3</sup> vorhanden war, gleich ca. 4,5 cm, die mit einer Pipette entnommen werden. Die Bestimmung von  $h_1$  liefert den Wert 4,45 cm. Es ist dann

$$v = a \cdot \frac{h_2}{h_2 - h_1} = a \cdot 1,217.$$

Die entnommene Hg-Menge bei 19,5° C wog 62,81 g = 4,63 cm<sup>3</sup>, das restierende Volumen des Hg ist also 5,56 cm<sup>3</sup>. Es ist demnach das Hilfsvolumen

$$v' = a \cdot 1,217 = 5,64 \text{ cm}^3$$

+ Restvolumen 5,56 cm<sup>3</sup> = 11,20 cm<sup>3</sup> =  $v$ .

Damit ist das Volumen des Gefäßes und der Capillare bis zu dem bei der Eichung gewählten Nullpunkte bestimmt. Da es in der Praxis zweckmäßig ist, den Skalenpunkt 15,0 des rechten Barometerschenkels als Nullpunkt anzunehmen, ist es nötig, den Inhalt des Capillarabschnittes zwischen Eichungsnullpunkt

und dem Punkt 15,0 abzuziehen, der entweder durch Auswiegen mit Hg bestimmt oder bei bekanntem Capillardurchmesser als Produkt von Querschnitt und Höhe berechnet werden muß.

Zusammenfassende Regeln bei der Eichung:

1. Absolut reine und trockene Gefäße mit möglichst kleinen Schliffen, die fest eingedreht und mit Gummischnüren festgehalten sein müssen.

2. Annähernde Konstanz des Wasserbades und des Luftdruckes.

3. Keine Luftblasen in den Capillaren.

4. Vor jeder neuen Einstellung von  $h_1$  bzw.  $h_2$  am besten eine Stunde warten. (Bleibt nämlich eine Spur Flüssigkeit an der rechten Barometercapillare haften, so komprimiert man bei jeder Bestimmung ein anderes  $v_1$  auf  $v_0$ , nämlich  $(v_1 - \Delta v_1)$ . Der erreichte Druck ist dann nicht  $p + h_1$ , sondern kleiner:

$$p \left( 1 - \frac{\Delta v_1}{v_2} \right) + h_1.$$

Zwei gleiche Werte im Abstand von einer Stunde sind beweisend. Fünf differierende Werte im Abstand von je  $\frac{1}{4}$  Stunde sind nicht zur Errechnung eines Mittelwertes geeignet.

5. Die Genauigkeit der Ermittlung von  $v$  wächst mit dem Wert  $\frac{a}{v}$ , sie erreicht den höchsten Wert theoretisch bei größtem  $a$ .

Praktisch darf dabei  $h_1$  nicht unter 4–5 cm absinken.

6. Bei größeren Gefäßen benutze man ein Hilfsvolumen  $v'$ . Zur Bestimmung von  $h_2$  fülle man soviel Hg ein, daß nur ca. 1,0–1,5 cm<sup>3</sup> Gasraum bleibt, zur Bestimmung von  $h_1$  entferne man soviel Hg, daß  $\frac{h_2}{h_1} = \frac{v}{v-a} > \frac{4}{1}$  und  $h_1 > 4$  cm bleibt.

Es ist  $v$  bzw.  $v' = a \frac{h_2}{h_2 - h_1}$ . Zu  $v'$  muß das Volumen des bei der Bestimmung von  $h_1$  noch im Gefäß befindlichen Hg addiert werden, um das Volumen  $v$  zu ermitteln.

Jede Ablesung muß sorgfältig im Spiegelbild mit beobachtet werden.

Die Eichung ermittelt das Gefäßvolumen mit einem Fehler von  $\pm 0$  bis  $\pm 0,2\%$ .

#### Die Untersuchungstechnik.

Prinzip<sup>1)</sup>. Entsteht oder verschwindet in einem konstanten Gasraum  $v_0$  ein Gas, so ändert sich der ursprüngliche Gasdruck  $p_0$ .

<sup>1)</sup> Vgl. Warburg: Biochem. Zeitschr. Bd. 100, S. 230, 1919; Bd. 142, S. 317, 1923; Bd. 152, S. 51, 1924.

Die Änderung des Druckes ist proportional der Veränderung der Gasmassen nach der Gleichung  $\frac{v_0 \pm v}{v_0} = \frac{p_0 \pm p}{p_0}$ , d. h. die Menge des entstandenen oder verschwundenen Gases ist bekannt bei bekanntem  $v_0$  und  $p$ . Es ist

$$\pm v = \pm \frac{p \cdot v_0}{p_0}.$$

Befindet sich in dem konstanten Raum  $v_0$  z. T. eine Flüssigkeit, die Gase nach Maßgabe des Partialdruckes im Gasraum löst und ist der Absorptionskoeffizient  $\alpha$ , so besteht, wenn man den Gasraum als  $v_G$  und das Flüssigkeitsvolumen als  $v_F$  bezeichnet (wobei  $v_G + v_F = v_0$  ist), die Beziehung

$$\pm v = \pm p \cdot \frac{(v_G + v_F \cdot \alpha)}{p_0},$$

da jede Druckänderung außer den Vorgängen im Gasraum auch die in der Flüssigkeit mit anzeigt. Für die von Warburg angegebene Apparatur wird der Ausdruck  $\frac{v_G + v_F \cdot \alpha}{p_0}$  auf ein Gasvolumen von 0° reduziert und als Gefäßkonstante

$$K = \left[ \frac{v_G \cdot \frac{273}{T} + v_F \cdot \alpha}{10000} \right]$$

(für das betreffende Gas) dargestellt.

Hierin bedeutet  $v_G$  das Volumen des Gasraumes in  $\text{cm}^3$ ,

$v_F$  das Volumen der Flüssigkeit in  $\text{cm}^3$ ,

$T$  die absolute Temperatur des Versuchs,

$\alpha$  den Absorptionskoeffizienten des Gases.

Es ist also

$$\pm v = \pm p K,$$

d. h. die entstandene oder verschwundene Gesamtmenge in  $\text{mm}^3$  ist gleich dem Produkte aus der Gefäßkonstante und der Druckzu- oder -abnahme in  $\text{mm}$  Brodie.

Diese Konstante gilt genau nur unter der Voraussetzung, daß der Atmosphärendruck 760 mm Hg ist. Für je 10 mm Unter- bzw. Überdruck ist die Konstante um 1,32 % zu klein bzw. zu groß. Für Orte mit dem Barometerdruck  $p$  ist der Nenner der Gefäßkonstante infolgedessen nicht 10000, sondern  $10000 \frac{p}{760}$

Die Konstante setzt ferner voraus, daß bei Änderung der Gas-

massen jederzeit das Absorptionsgleichgewicht zwischen Gasraum und Flüssigkeit besteht. Um diese Voraussetzung in hoher Annäherung zu erfüllen, ist die Apparatur mit einer Schüttelvorrichtung versehen, deren Amplitude an der Exzentersteuerung und deren Frequenz durch verschiedene Übersetzer bzw. einen Regulierwiderstand am Motor reguliert werden können.

Die in dem Kontrolltrog (Leerversuch) vor sich gehenden Prozesse beschränken sich bei Ausschluß der Atmung wohl vorwiegend auf autolytische Vorgänge. Die hierbei auftretenden Säuren treiben aus dem Bicarbonat der Ringerlösung eine äquivalente, meist kleine  $\text{CO}_2$ -Menge aus (gelegentlich zu beobachtende negative Druckänderungen sind zweifellos auf Gasabsorption von seiten der Ringerlösung zurückzuführen). Dieser Wert muß noch von dem berechneten abgezogen werden (multipliziert mit der Gefäßkonstante des entsprechenden Gefäßes. Also Korrektur in  $\text{cm}^3$ ). Sind die Druckdifferenzen nur auf Temperatur und Luftdruckschwankungen zurückzuführen (Kontrollgefäß als Thermobarometer), so wird einfach der abgelesene Höhenunterschied subtrahiert. (Also Korrektur in mm.)

Aus der durch die Tributyrin-Spaltung freigewordenen Kohlensäure (cmm) erhält man die gebildete Buttersäure in Mikromolen durch Division mit 22,4. Diese Werte gelten im allgemeinen als Maß der Tributyrin-spaltung. Der dritte Teil stellt die zersetzte Tributyrinmenge in Mikromolen dar, während der zehnte Teil die Buttersäuremenge in Milligrammen ergibt. (Molekulargewicht der Buttersäure = 100.) Für Gewebsschnitte werden alle Werte auf 1 mg Trockensubstanz bezogen.

Ausführung: Der Trog (Abb. 46) wird mit  $2,7 \text{ cm}^3$  Serumverdünnung oder bei Versuchen mit Gewebe mit der gleichen Menge Ringerlösung beschickt. Die Schnitte werden an einer Glasnadel befestigt. In die Retorte kommen  $0,3 \text{ cm}^3$  einer Tributyrinemulsion,

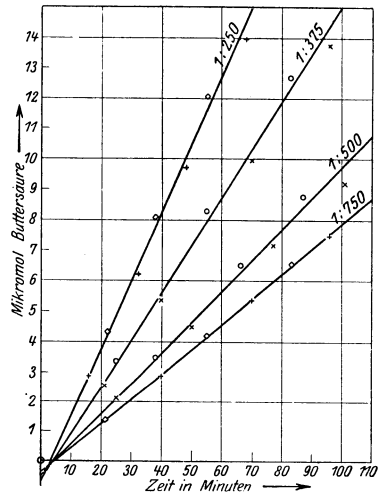


Abb. 49.

Gefäß Nr.	1	2	3	4
Zeichen	×	+	○	◇

die  $1 \text{ cm}^3$  Tributyrin auf  $100 \text{ cm}^3$  Ringerlösung<sup>1)</sup> enthält. Nachdem die gefüllte Retorte mit dem Troge und dieser mit dem Helm des Barcroftmanometers und dieser mit der gefüllten Retorte verbunden ist, wird unter Schütteln ein Gemisch von 5 Vol.-Proz. Kohlensäure + 95 Vol.-Proz. Stickstoff eingeleitet<sup>2)</sup>. Das Gas tritt an dem rechten Schenkel des Manometers ein (dem mit Hahn versehenen) und an dem Tubus des Helms wieder aus.

In die Retorte des Kontrolltroges kommen  $0,3 \text{ cm}^3$  Ringerlösung. Nun werden die Apparate ins Wasserbad gesetzt und zwecks Temperaturlausgleichs etwa 10 Minuten geschüttelt (Schüttelvorrichtung vgl. Abb. 60, S. 200).

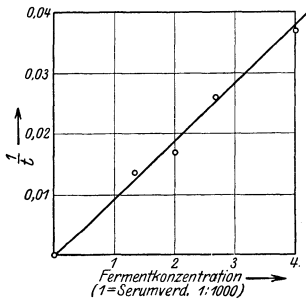


Abb. 50. Reziproke Zeitwerte für 6 Mikromol Buttersäure, abgelesen aus Abb. 49.

Die Bewegung hat bei nicht zu großer Amplitude etwa eine Frequenz von 100—120 pro Minute. Unmittelbar nach dem Eintauchen der Gefäße in das Wasserbad dehnt sich das Gas aus und drückt die rechten Barometerschenkel nach unten. Man kann diese anfängliche Druckzunahme ausgleichen, indem man — bei dem nötigen Überdruck im linken Schenkel — ganz kurz den Hahn öffnet, wobei etwas Gas entweicht, Luft aber nicht eindringen kann. Bleibt das Thermobarometer

konstant, so ist der Temperaturlausgleich beendet und die Ablesungen können beginnen. Man dreht die Retorte nach oben um, die Tributyrinemulsion fließt in den Trog und der Prozeß beginnt. Die Einstellung auf die Nullmarke und Ablesung des Manometerstandes wird sofort im Anschluß daran vorgenommen. Die Berechnung wird, wie oben ausgeführt, vorgenommen.

Ein Beispiel<sup>3)</sup> gibt die folgende Tabelle auf S. 115.

## Andere Esterasen.

### Phosphatasen.

Phosphatasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäureestern der Kohlehydrate und Proteine, ferner die Abspaltung von Phosphorsäure aus Nucleinsäuren.

<sup>1)</sup> Die Ringerlösung enthält  $100 \text{ cm}^3$  9 pro mille NaCl +  $2 \text{ cm}^3$  1,2 proz. KCl +  $2 \text{ cm}^3$  1,76 proz.  $\text{CaCl}_2$  (kryst.) +  $20 \text{ cm}^3$  1,26 proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung. („Ringerlösung für Glykolyse“ nach Warburg).

<sup>2)</sup> Jedes Gasmisch muß vor der Verwendung analysiert werden.

<sup>3)</sup> l. c. Tab. IX, S. 517, und Abb. 7.

Tabelle (Abb. 49 und 50).

Meerschweinchenserum (3 Tage alt).

1. 2,7 cm<sup>3</sup> Serumverdünnung in Ringer + 0,3 cm<sup>3</sup> Ringerlösung (Kontrolle).
2. 2,7 cm<sup>3</sup> Serumverdünnung in Ringer + 0,3 cm<sup>3</sup> Tributyrinemulsion in Ringer.

Temperatur: 37,5° C.

Zeit Min.	1. Ringer ohne Tributyrin (Kontrolle)	2. Ringer mit Tributyrin					
	Druckänderung in mm <i>Brodie</i>	Druck- erhöhung in mm <i>Brodie</i>	CO <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	Gebildete <i>Butter- säure</i> Mikro- mole	Druck- erhöhung in mm <i>Brodie</i>	CO <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	Gebildete <i>Butter- säure</i> Mikro- mole
Serumverdünnung: 1:250.							
	Gefäß Nr. 8 (Konstante: 48)	Gefäß Nr. 2 (Konstante: 1,55)			Gefäß Nr. 4 (Konstante: 1,54)		
16	+ 0,5	42,0	64,4	2,88			
22	+ 1,5	→			64,5	97,1	4,33
32	+ 2,0	91,5	138,8	6,20			
38	+ 5,0	→			122,5	181,3	8,09
48	+ 5,0	145,0	217,4	9,71			
55	+ 5,5	→			181,0	270,6	12,08
68	+ 6,5	208,0	312,8	13,96			
Serumverdünnung: 1:375.							
	Gefäß Nr. 5 (Konstante: 1,39)	Gefäß Nr. 1 (Konstante: 1,46)			Gefäß Nr. 3 (Konstante: 1,54)		
21	+ 3,5	42,0	56,4	2,52			
25	+ 3,0	→			51,0	74,3	3,32
40	+ 4,0	86,0	120,0	5,36			
55	+ 5,0	→			125,0	185,5	8,28
70	+ 6,0	158,0	222,3	9,92			
83	+ 7,0	→			190,5	283,6	12,66
96	+ 7,5	218,0	307,8	13,74			
Serumverdünnung: 1:500.							
	Gefäß Nr. 5 (Konstante: 1,39)	Gefäß Nr. 1 (Konstante: 1,46)			Gefäß Nr. 3 (Konstante: 1,54)		
25	+ 1,0	33,5	47,5	2,12			
38	+ 5,0	→			54,5	77,0	3,44
50	+ 5,0	73,5	100,4	4,48			
66	+ 6,0	→			100,0	145,7	6,50
77	+ 8,5	118,0	160,5	7,17			
87	+ 9,5	→			135,5	196,2	8,76
101	+ 9,5	149,5	205,8	9,19			
Serumverdünnung: 1:750.							
	Gefäß Nr. 8 (Konstante: 1,48)	Gefäß Nr. 2 (Konstante: 1,55)			Gefäß Nr. 4 (Konstante: 1,54)		
21	+ 2,5	→			22,5	31,0	1,38
40	+ 3,0	44,5	64,6	2,88			
55	+ 5,5	→			66,5	94,3	4,21
70	+ 5,0	82,0	119,7	5,34			
83	+ 6,0	→			101,5	147,4	6,58
96	+ 6,5	114,0	167,1	7,46			

Die Bestimmungen der Phosphatasen beruhen meist auf der Bestimmung der bei der fermentativen Spaltung gebildeten Phosphorsäure. Eine einfache und gute Methode ist die Mikromethode nach Lieb.

Bestimmung des Phosphors nach H. Lieb<sup>1)</sup>.

Prinzip. Die Bestimmung des Phosphors in kleinen Mengen organischer Substanzen beruht auf der Oxydation und Überführung des Phosphors durch oxydierende Schmelzen in Phosphorsäure und Fällung derselben als Ammoniumphosphormolybdat (von der annähernden Zusammensetzung  $(\text{NH}_4)_3 \text{PO}_4 \cdot 14 \text{MoO}_3$ ). Aus der Menge des Molybdatniederschlags, dessen chemische Zusammensetzung nicht genau bekannt ist, wird mittels eines empirischen Faktors der Phosphor- resp. der Phosphorsäuregehalt berechnet. Bei der Bestimmung der aus Phosphorsäureestern fermentativ freigemachten Phosphorsäure fällt die Veraschung natürlich fort. Da aber bei vielen Untersuchungen gleichzeitig eine Gesamtphosphorbestimmung des Substrates notwendig ist, sei hier die Methode für die Bestimmung des Gesamtphosphors beschrieben.

Schmelze: Die Zerstörung der organischen Substanz und Oxydation des Phosphors zu Phosphorsäure läßt sich am besten durch Erhitzen und Schmelzen der Verbindung mit oxydierenden Zusätzen durchführen. Vielfach wird es genügen, die Substanz im Platinschiffchen mit Soda und Salpeter zu mischen, zu überschieben und im Sauerstoffstrom zu erhitzen. Dies erfolgt in einem ungefähr 150 mm langen, 10 mm weiten Jenaer Hartglasrohr, von dem das eine Ende zu einer weiten Capillare ausgezogen und rechtwinklig nach aufwärts gebogen ist.

Reagenzien: 1. Sulfatmolybdänreagens: 50 g Ammonsulfat werden mit 500 cm<sup>3</sup> Salpetersäure ( $D = 1,36$ ) in einem Literkolben gelöst. Ferner werden 150 g zerkleinertes Ammoniummolybdat in einer Porzellanschale mit 400 cm<sup>3</sup> siedend heißem Wasser versetzt und durch Umrühren in Lösung gebracht. Nach dem Abkühlen gießt man diese in dünnem Strahl unter Umrühren in die erste Lösung und füllt zu einem Liter auf. Nach zweitägigem Stehen filtriert man durch Asbestfilter das fertige Reagens in eine Flasche aus braunem Glas und bewahrt es gut verschlossen an einem dunklen und kühlen Orte auf.

2. Schwefelsäurehaltige Salpetersäure. Man gießt 30 cm<sup>3</sup>  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $D = 1,84$ ) zu einem Liter  $\text{HNO}_3$  ( $D = 1,19 - 1,21$ ).

<sup>1)</sup> Aberhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Teil 3, Heft 1, S. 384. (Die Darstellung der Methode folgt den dort mitgeteilten Angaben.) — Kuhn: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 129, S. 64. 1922.

Letztere erhält man durch Vermischen von 357 cm<sup>3</sup> HNO<sub>3</sub> von  $D = 1,40$  mit 500 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O.

3. 2prozentige wässrige Lösung von reinem Ammoniumnitrat. Wenn die Lösung nicht schon schwach sauer reagiert, ist sie mit einigen Tropfen HNO<sub>3</sub> pro Liter anzusäuern.

4. Reiner 95prozentiger Alkohol.

5. Reiner, möglichst alkohol- und wasserfreier Äther, der beim Verdunsten keinen Rückstand hinterläßt und nicht alkalisch reagieren darf.

6. Reines Aceton, das keine über 60° siedenden Anteile enthält und frei von Aldehyd ist.

7. Reinste, feingepulverte calcinierte Soda und reinstes, feingepulvertes Kaliumnitrat im Mischungsverhältnis 1:1 für die oxydierende Schmelze.

Ausführung: Für die Bestimmung wägt man gewöhnlich 2—5 mg Substanz in ein Platinschiffchen (bei phosphorarmen Substanzen [0,3—0,2%] sind 10—20 und mehr mg Substanz erforderlich). Das Platinschiffchen muß dann entsprechend [20 × 5 × 4 mm] größer sein), setzt einen Überschuß des Sodasalpetergemisches zu, mischt mit einem kurzen Platindraht mit Öse, den man dann in das Schiffchen legen kann, sorgfältig durch und bedeckt noch mit dem Oxydationsgemisch. Nach Einführung des Schiffes in das Verbrennungsröhrchen, das man in passender Höhe horizontal in eine Stativklemme einspannt, schaltet man einen langsamen Sauerstoffstrom ein (noch besser ist, um ein Verspritzen der Schmelze zu vermeiden, die Erhitzung im Luftstrom zu beginnen und erst die gebildete Kohle im Sauerstoffstrom zu verbrennen [Kuhn]), und beginnt mit dem Erhitzen vor dem Schiffchen, d. h. man verschiebt den Bunsenbrenner entgegen der Richtung des Gasstromes. Nachdem man anfangs zur Vermeidung einer plötzlichen Verpuffung vorsichtig erhitzt hat, glüht man schließlich die Stelle des Rohres, an der sich das Schiffchen befindet, heftig, um das Schmelzen des Oxydationsgemisches herbeizuführen. Nach dem Erkalten wird das Schiffchen in einem kleinen Reagensglase mit verdünnter HNO<sub>3</sub> ausgekocht und die Lösung quantitativ durch ein Filterchen in das mit Chromschwefelsäure und Wasser gereinigte Fällungsgefäß, ein dickwandiges, weites Reagensglas filtriert. Falls während der Verbrennung von der Schmelze etwas in das Rohr verspritzt ist, wird auch dieses mit heißer, verdünnter Salpetersäure ausgespült; im schiefgehaltenen Verbrennungsröhrchen können die verspritzten Anteile leicht in Lösung gebracht und durch die Capillare ausgegossen werden.



Das Filtrat wird mit der schwefelsäurehaltigen  $\text{HNO}_3$  versetzt, nötigenfalls mit Wasser auf  $15 \text{ cm}^3$  ergänzt und im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Entfernung aus dem Wasserbad schwenkt man die heiße Lösung um, gießt in die Mitte derselben  $15 \text{ cm}^3$  Sulfatmolybdänreagens, läßt das Gefäß 3 Min. ruhig stehen und schwenkt dann wieder eine halbe Minute kräftig um. Den gelben Niederschlag läßt man mindestens eine Stunde sich absetzen, bevor man an das Absaugen geht. Kuhn weist jedoch darauf hin, daß die Niederschlagsbildung 1 Stunde nach der Fällung noch lange nicht vollständig ist. Die weniger als  $0,5 \text{ mg}$  Phosphor enthaltenden Niederschläge muß man 6—18 Stunden, die weniger als  $0,05 \text{ mg}$  enthaltenden bis zu 36 Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen.



Zum Absaugen dient ein Preglsches Filtrerröhrchen (Abb. 51). Es besteht aus einem  $180 \text{ mm}$  langen Glasröhrchen von  $4 \text{ mm}$  Dicke, an das ein  $40 \text{ mm}$  langes Glasröhrchen von  $10 \text{ mm}$  äußerem Durchmesser derart angeschmolzen ist, daß sich dort das Lumen auf  $0,5 \text{ mm}$  verengt und ein flacher Raum zur Aufnahme der Asbestmasse entsteht. Über diesem Raum verengt sich die Röhre um einige Millimeter, um die Asbestmasse am Emporsteigen und Trockenwerden zu verhindern. Darüber ist die Röhre auf  $11$  oder  $12 \text{ mm}$  erweitert, um sich nach oben wieder zu verengen und einen kurzen Halsteil mit Rand zu bilden. (Sehr zu empfehlen sind die Filtrerröhrchen mit eingeschmolzener Glasplatte (Firma Schott), die man noch mit einer Lage Asbest beschicken kann.) Das Filtrerröhrchen wird zuerst mit Ammoniak behandelt, um

Abb. 51. etwa noch von einer früheren Bestimmung her vorhandenes Phosphorammoniummolybdat in Lösung zu bringen, dann mit Wasser, heißer verdünnter Salpetersäure, und schließlich wieder mit Wasser gespült. Das Röhrchen wird mittels Alkohol und Äther oder besser Aceton getrocknet.

Das Filtrerröhrchen kommt nach dem Abwischen mit feuchtem Flanell und trockenem Rehllederlappchen auf mindestens eine halbe Stunde in einen Exsiccator, der kein Trocknungsmittel enthalten soll und der an der Wasserstrahlpumpe gut evakuiert wird.

Das erst unmittelbar vor dem Absaugen aus dem Exsiccator genommene Filtrerröhrchen wird sofort auf die Wage gelegt und die Zeit von der Entnahme aus dem Exsiccator bis zur Wägung notiert. Man wäge am besten nach 3—5 Minuten, ohne die Gewichtskonstanz des Röhrchens abzuwarten. Die Genauigkeit

braucht nur 0,05—0,1 mg zu erreichen (da der Niederschlag rund 69 mal so schwer ist als das zu bestimmende Element), wozu jede analytische Waage ausreicht, die eine Genauigkeit von 0,1 mg zuläßt. Wenn nach dem Absaugen des Niederschlages die Wägung unter denselben Bedingungen vorgenommen wird, macht man keinen das Resultat irgendwie beeinflussenden Fehler. Außer der Zeitersparnis hat das rasche Wägen sogar den Vorteil, daß sich die Hygroskopie des Phosphormolybdates weniger bemerkbar macht.

Die automatische Überführung des Niederschlages wird durch nebenstehende Abb. 52 klar gemacht. Der Rohrdurchmesser des Heberrohres *H* (das vor Gebrauch mit Schwefelchromsäure und Wasser gereinigt wird) soll nicht mehr als 4 mm betragen. Der etwa 250 mm lange Schenkel wird fast bis zum Boden des den Niederschlag enthaltenden Reagensglases *R* eingesenkt. Das Ansaugen der Flüssigkeit mit der Pumpe erfolgt mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 2 Tropfen in der Sekunde.

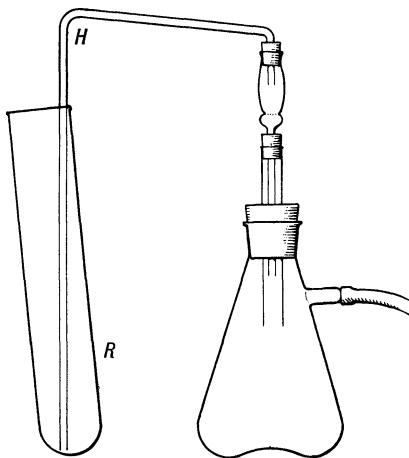


Abb. 52.

Den Niederschlag bringt man mittels dieser Absaugvorrichtung auf die Filterschicht. Nach dem Absaugen der über dem Niederschlag stehenden Flüssigkeit wäscht man diesen mit der 2prozentigen Ammoniumnitratlösung aus und senkt erst jetzt das Saugrohr bis auf den Boden des Reagensglases. Nach dem Nachwaschen mit Ammoniumnitratlösung werden durch abwechselndes Abspülen der Gefäßränder mit Ammoniumnitratlösung und Alkohol aus einer Spritzflasche die letzten Spuren des Niederschlages auf das Filter gebracht. Nach Abnehmen des Heberrohres füllt man das Filterröhrchen zweimal mit Aceton (oder einmal mit Alkohol und zweimal mit Äther), worauf es aus der Absaugvorrichtung entfernt, abgewischt und in den Exsiccator gebracht wird. Nach dem Evakuieren desselben bleibt das Filterröhrchen mindestens eine halbe Stunde im luftverdünnten Raum und wird also unter denselben Bedingungen wie das leere Röhrchen wieder mit einer Genauigkeit von 0,05—0,1 mg gewogen.

Durch Multiplikation der erhaltenen Gewichtsmenge mit dem

Faktor 0,014524 [nach Kuhn 0,01456] erhält man das Gewicht des in der angewandten Substanz enthaltenen Phosphors in Milligramm, durch Multiplikation des Gewichts mit 0,03331 das Gewicht des P als  $P_2O_5$ . Die Resultate stimmen bei Einhaltung der Bedingungen innerhalb eines Zehntelprozentes überein. Diese Vorschrift von Lieb erlaubt die Bestimmung von Phosphormengen bis zu 0,03 mg (Kuhn).

Kuhn fällt die Phosphorsäure nach Lieb in 100 cm<sup>3</sup> Jenaer Bechergläser und bestimmt das Ammonphosphormolybdat titrimetrisch. Nach dem Stehen über Nacht wird die Mutterlauge vorsichtig durch 5—7 cm gehärtete Filter (Schleicher-Schüll) abgessogen und der Niederschlag dreimal mit etwas eiskaltem 50 prozentigen Alkohol (Spritflasche) ausgewaschen. Der Filterrückstand wird vom auseinandergelegten Filter mit einem scharfen Wasserstrahl sorgfältig ins Becherglas zurückgespült. Es wird mit etwa dem Doppelten der zur Lösung erforderlichen Menge  $\frac{1}{10}$ -n-NaOH mindestens eine halbe Stunde zum Sieden erhitzt, so daß das Volumen von 50 cm<sup>3</sup> auf etwa 10 cm<sup>3</sup> zurückgeht. Dann wird mit 5 Tropfen 5 $\frac{0}{100}$ iger Phenol- oder Thymolphthaleinlösung versetzt, angesäuert (3—5 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$ -n-Säure im Überschuß) 10—15 Minuten gekocht, unter der Wasserleitung abgekühlt und auf rosa bzw. hellblau titriert. Bestimmungsbereich: bis 0,1 mg P. Die Anzahl der zugefügten  $\frac{1}{10}$ -n-Natronlauge abzüglich der verbrauchten cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$ -n-Säure ergeben mit 0,1104 multipliziert die Menge P in mg.

Bestimmung der Phosphorsäure nach G. Embden.

Bei der gravimetrischen Methode für kleine Phosphorsäuremengen zwischen etwa 1 mg und höchstens 4 mg  $P_2O_5$  nach G. Embden<sup>1)</sup> wird das Fällungsreagens (Strychnin-Molybdänsäure in  $HNO_3$ ) wie folgt hergestellt. Eine bestimmte Menge Ammoniummolybdat wird unter Erwärmen in Wasser gelöst und die Lösung auf genau das Dreifache des dem Molybdatgewicht entsprechenden Volumens (50 g z. B. auf 150 ccm) aufgefüllt; wenn nötig, wird diese Flüssigkeit filtriert. Man läßt 1 Volumteil der so gewonnenen Molybdatlösung unter Umschütteln aus der Pipette in 3 Volumteile einer Salpetersäure einfließen, die durch Verdünnen von 2 Volumteilen reiner Salpetersäure vom spez. Gewicht 1,40 mit 1 Volumteil Wasser hergestellt wurde. Die so erhaltene klare und farblose Lösung („Molybdänsalpetersäure“) bleibt, solange keine Molybdänsäure ausfällt, verwendbar. Das eigentliche Fällungsreagens wird immer erst unmittel-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 113, S. 138. 1921.

bar vor der Ausfällung der Phosphorsäure hergestellt, indem man 1 Volumteil einer Strychninlösung, die im Liter 15 g Strychninnitrat (unter Erwärmen gelöst) enthält, in 3 Volumen Molybdänsalpetersäure unter Schütteln einfließen läßt. Die Fällung (in etwa 60 cm<sup>3</sup> der Phosphorsäurelösung) geschieht durch rasches Einfließenlassen von 20 cm<sup>3</sup> des Fällungsreagens. Mit dem Abfiltrieren des amorphen Niederschlages wird 30—40 Minuten gewartet, wobei die Flüssigkeit wiederholt geschüttelt wird. Die Filtration geschieht durch asbestbeschickte gewogene Goochtiigel, die bei 105—110° getrocknet sind, unter Anwendung sehr geringen Druckes. Das Überspülen des Niederschlages erfolgt zunächst mit 25 cm<sup>3</sup> eisgekühltem, auf das Fünffache seines Volumens mit Wasser verdünntem „Fällungsreagens“. Nachdem dann mit eisgekühltem Wasser gewaschen ist, bis das abfließende Waschwasser empfindliches blaues Lackmuspapier nicht mehr rötet, wird der Goochtiigel bei 105—110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (60—90 Minuten sind stets genügend) und gewogen. Das Gewicht des Niederschlages ist sehr annähernd das 39fache vom P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Gewicht, also das 28,24fache des H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Gewichtes und das 89,32fache des angewandten P.

Bei organischen Phosphorverbindungen wird die Substanz mit dem Neumannschen Säuregemisch (meist 2 ccm) verascht, die Nitrosylschwefelsäure beseitigt, mit NH<sub>3</sub> oder reiner NaOH neutralisiert, auf annähernd 60 ccm aufgefüllt und wie oben angegeben gefällt. Ein großer Vorteil der Methode ist, daß man die anorganische Phosphorsäure bei Gegenwart von organischen Phosphorsäureverbindungen in der Kälte ausfällen und schon nach ganz kurzem Stehen den zu wägenden Niederschlag abfiltrieren kann. Hiermit ist die Gefahr, daß während der Bestimmung anorganische Phosphorsäure aus organischer Phosphorsäure abgespalten wird, auf ein Mindestmaß beschränkt. Lactacidogenhaltige eiweißfreie Muskelextrakte bleiben nach dem Abfiltrieren des bei der Ausfällung entstandenen Niederschlages während einer ganzen Reihe von Stunden vollkommen klar.

Von den Phosphatasen seien erwähnt:

1. die Glycerophosphatase, die den Zerfall des Glycerinphosphorsäureesters katalysiert. Das Ferment wirkt erst nach vorheriger Verseifung des Lecithins, während unversehrtes Lecithin nicht angegriffen wird<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Vgl. Grosser u. Husler: Biochem. Zeitschr. Bd. 39, S. 1. 1912. — Nemeč: Biochem. Zeitschr. Bd. 93, S. 97. 1919; A. Nemeč: Bd. 137, S. 570. 1923. — Akamatsu: Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 184. 1923.

Bestimmung nach Neuberg und Karczag<sup>1)</sup>.

Als Substrat dient Natriumglycerophosphat von Kahlbaum, das keine Spur einer Reaktion auf anorganische Phosphorsäure geben soll. Der Ester wird bei 29° im Thermostaten 48 Std. der Einwirkung der Hefe überlassen (z. B. in der Arbeit von Neuberg und Karczag 4,3 g Glycerinphosphorester + 10 g Hefe + 200 cm<sup>3</sup> Wasser) und die gebildete Phosphorsäure als Ammoniummagnesiumphosphat gefällt, aus diesem die Molybdänverbindung erhalten, die wieder in Ammoniummagnesiumphosphat übergeführt und als Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> zur Wägung gebracht wird.

2. die Saccharophosphatase<sup>2)</sup>. Das Ferment wurde von Neuberg untersucht.

Beispiel. 10,0 cm<sup>3</sup> 5 prozentige Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium (C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>10</sub> · O · PONa<sub>2</sub>), 1,0 g frische Oberhefe, 1,0 cm<sup>3</sup> Toluol. Temp. 25°. — Nach drei Tagen gibt die klarfiltrierte Flüssigkeit eine äußerst starke Fällung mit Magnesia-mischung und reduziert Fehlingsche Lösung kräftig. — Die Saccharophosphatase ist auch in Unterhefe vorhanden. Beide wirken sowohl in neutraler wie schwach alkalischer und schwach saurer Reaktion. „Durch die Wirksamkeit in der lebenden Hefe ist die Saccharophosphatase von der Hexosediphosphatase unterschieden. Letztere ist außerstande, die Salze der Hexosediphosphorsäure (vgl. S. 188) 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“ (Djenab und Neuberg).

Über Hexosephosphorsäure<sup>3)</sup> vgl. S. 181, 188.

#### Sulfatase<sup>4)</sup>.

Die Sulfatase katalysiert den Zerfall der Schwefelsäureester. Sie findet sich nach Neuberg und Mitarbeitern in der Taka-diastase sowie in tierischen und menschlichen Organen, besonders reichlich in Niere, Gehirn, Leber.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 60. 1913.

<sup>2)</sup> Djenab, K. u. C. Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 82, S. 391. 1917. Vgl. fermer Neuberg, C. u. M. Behrens: Biochem. Zeitschr. Bd. 170, S. 254. 1962.

<sup>3)</sup> Harden u. Young: Proc. of the roy. soc. of London, Ser. B. Bd. 82, S. 321. 1910. — Über Amylophosphatasen, Phytase, Aminophosphatasen vgl. Oppenheimer: Die Fermente. S. 521. — Über Tannase vgl. Freudenberg, K. u. E. Vollbrecht: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 116, S. 277. 1921. — Über Chlorophyllase vgl. Willstätter, R. u. A. Stoll: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 378, S. 18. 1910; Bd. 380, S. 148. 1911.

<sup>4)</sup> Neuberg u. Kurono: Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 295. 1923. Neuberg, C. u. K. Linhardt: Ebenda. Bd. 142, S. 191 (1923). Noguchi, J.: Bd. 143, S. 186. 1923. Noguchi, J.: Ebenda. Bd. 144, S. 138 (1924).

**Bestimmung.** Als Substrat dient phenolschwefelsaures Kalium oder *p*-kresolschwefelsaures Kalium. Als Fermentpräparate verwandten Neuberg und Mitarbeiter<sup>1)</sup> sowohl Frischpräparate aus zerkleinerten Organen, als auch Acetontrockenpräparate. Ein gutes Trockenpräparat wird gewonnen, indem die feinzerschnittenen Gewebe rasch in die etwa 7fache Menge reinen, frisch über  $\text{CaCl}_2$  destillierten Acetons unter dauerndem Umrühren eingetragen und dann 10 Minuten kräftig im Mörser verrieben werden. Darauf wird abgesaugt und dieselbe Operation mit der dreifachen Menge Acetons noch zweimal je 3 Minuten wiederholt. Nach scharfem Abnutschen wird das Gewebe in die dreifache Menge absoluten über Natrium getrockneten Äthers eingetragen, einige Minuten verrührt, das Material auf der Nutsche abgepreßt, auf Fließpapier getrocknet. Zur Neutralisation und zum Abfangen der entstehenden Schwefelsäure dient  $\text{CaCO}_3$  als Bodenkörper. Es wird nicht das entstehende Sulfat bestimmt, sondern der unzerlegt gebliebene Anteil.

Beispiel<sup>1)</sup>: 25 g Leberbrei, 1,5 g phenolätherschwefelsaures Salz, 150  $\text{cm}^3$  Wasser, 1,5  $\text{cm}^3$  Toluol, 10 g  $\text{CaCO}_3$ . Das Ganze kommt bei 37° in den Brutschrank. Unmittelbar nach dem Zusammenbringen der 1proz. Lösung des ätherschwefelsauren Salzes mit den Organen werden 10  $\text{cm}^3$  des Gemisches entnommen, in einen 50  $\text{cm}^3$  Meßkolben hineinpipettiert, darauf mit 10,0  $\text{cm}^3$  alkalischer Chlorbariumlösung versetzt, die 1 Volumen 10proz. Lösung von  $\text{BaCl}_2 + 2$  Volumen gesättigten Barytwassers enthält, und auf 50  $\text{cm}^3$  aufgefüllt. Nach 24stündigem Stehen wird durch ein trockenes Faltenfilter filtriert; 35,0  $\text{cm}^3$  werden zur Analyse entnommen. Die Lösung wird mit einer genügenden Menge verdünnter Salzsäure versetzt und zum Sieden erhitzt, wodurch die im Filtrat enthaltene Menge ungespaltenen Schwefelsäureesters hydrolysiert wird. Die ausgeschiedene Menge Bariumsulfat wird gewogen.

## B. Kohlehydratspaltende Fermente.

### Saccharase (Invertin).

Das Ferment katalysiert die Spaltung des Rohrzuckers (Saccharose) in äquimolekulare Mengen Traubenzucker und Fruchtzucker (Invertzucker).

Darstellung der Saccharase aus Hefe. Man gewinnt die Saccharase aus den Hefen, indem man die Zellwände mittels Autolyse zerstört.

<sup>1)</sup> Neuberg, C. u. E. Simon: Biochem. Zeitschr. Bd. 156, S. 365 (1925).

Verfahren von Hudson<sup>1)</sup>. (Rasche Autolyse bei Anwendung von Toluol.)

Die frische Preßhefe wird in das gleiche bis doppelte Gewicht Wasser eingetragen, mit 5—10% ihres Gewichtes an Toluol vermischt und nach kräftigem, wiederholtem Durchschütteln bei Zimmertemperatur etwa 7 Tage der Autolyse überlassen. Nach einer Woche filtriert man die Hefeflüssigkeit ab. Dann behandelt man die Saccharaselösung zur Entfernung von Eiweißkörpern mit Bleiacetat, wobei ein Bleiüberschuß zu vermeiden ist (Tüpfelprobe mit Schwefelammonium). Das Filtrat wird mit H<sub>2</sub>S und spanischer Klärerde behandelt und filtriert. Willstätter und Racke<sup>2)</sup> tragen die Frischhefe in das gleiche oder doppelte Gewicht Wasser, versetzen mit Toluol und Essigester (je 50 cm<sup>3</sup> auf 1 kg). Die auftretende Säure wird mit verdünntem Ammoniak neutralisiert. Versetzt man nach 3—4 Tagen die Enzymlösung mit Essigsäure, so entsteht ein starker Eiweißniederschlag; man filtriert nach einer Stunde und verfährt weiter wie Hudson. Oder man behandelt die Enzymlösung mit Ammoniumphosphat, auf 1 kg Frischhefe 25 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> (da fällt die Essigsäurebehandlung fort). Die filtrierte Saccharaselösung befreit man von Phosphorsäure und Eiweiß mit Bleiacetat oder man fällt zuerst mit MgCl<sub>2</sub> die Phosphorsäure und enteiweißt das Filtrat mit Bleizucker.

Geht man von Trockenhefe aus (am besten verfährt man so, daß man die Hefe an der Luft ausbreitet und langsam trocknet), so wird diese gemahlen, dann mit der 10fachen Menge Wasser und mit der gleichen oder halben Menge Toluol vermischt, einige Zeit gerührt oder geschüttelt. Für die Reinheit des Invertins ist es vorteilhafter, die Auflösung in 2—3 Tagen bei Zimmertemperatur vor sich gehen zu lassen, als das Verfahren durch Erwärmen abzukürzen. Auch hier ist das Neutralisieren von Vorteil.

Zur Darstellung sind junge Rassen untergäriger Hefe, die in zuckerhaltiger Nährlösung bei einem  $p_h$  von 4,2—4,4 unter Zusatz von Hefewasser, welches das Eiweiß der zerfallenden Hefezellen enthält und bei einer Temperatur von 26—30° gezüchtet werden, am besten geeignet. („Angereicherte Unterhefe“.)

Darstellung nach Euler und Josephson<sup>3)</sup> Als Ausgangsmaterial dient eine durch Vorbehandlung mit Rohrzucker und

<sup>1)</sup> Hudson, C. S. u. Paine: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 32, S. 774. 1910. — Hudson, C. S.: Ebenda Bd. 36, S. 1566. 1914.

<sup>2)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1. 1920/21.

<sup>3)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 446 u. 453. 1923.

Phosphat angereicherte Unterhefe (vgl. S. 127). Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert. Unter Zusatz von etwas Toluol und Äthylacetat wird die Hefe der Autolyse überlassen. Nach einer Woche wird filtriert. Der Saft wird unter kräftigem Rühren mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt, worauf die entstandene Fällung sofort auf einem Büchnertrichter abgesaugt wird. Die Fällung wird etwa 30 Std. mit Wasser unter Zusatz von Toluol digeriert. Beim Absaugen wird schließlich ein klares, bräunliches Filtrat erhalten. Die wässrige Lösung wird etwa mit  $\frac{1}{4}$  ihres Volumens Alkohol versetzt und der Hälfte ihres Volumens einer Tonerdesuspension, die etwa 25 g  $\text{Al}(\text{OH})_3$  enthält. Die Sorption der Saccharase ist fast vollständig. Das Sorbat wird abgesaugt, mit destilliertem Wasser gewaschen und in der Hälfte des Gesamtvolumens einer Lösung von 0,3proz. Kaliumarseniat + 0,1proz. Ammoniak aufgeschlämmt. Nach halbstündigem, kräftigem Schütteln wird die Elution abgesaugt. Die Lösung wird mit Essigsäure neutralisiert und  $1\frac{1}{2}$  Tage durch Kollodiumschläuche dialysiert.

Eine weitergehende Reinigung gelingt durch weitere Adsorption an Kaolin; danach wiederum Tonerdeadsorption (etwa 2 g). Eluiert wird mit 0,6proz. Kaliumarseniat und 0,1proz. Ammoniak. Die schwach ammoniakalische Elution wird mit Salmiak und Magnesiumchlorid versetzt, wobei das Arsen zum größten Teil ausfällt. Dann viertägige Dialyse.

Darstellung nach Euler und Josephson unter Verwendung von gealtertem Autolysensaft<sup>1)</sup>. Hefe wird ca. 1 Monat teils bei Zimmertemperatur, teils bei 35° autolytisch. Bei Zusatz von Alkohol entsteht eine sehr geringe Fällung. Die Fällung wird in Wasser gelöst. Die Lösung (1250 cm<sup>3</sup>) wird auf 5 l verdünnt und mit 250 cm<sup>3</sup> Tonerdehydrat-Emulsion, enthaltend 8,5 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , versetzt. Das Sorbat wird abgesaugt, mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 800 cm<sup>3</sup> 1proz. Natriumarseniat + 0,1% Ammoniak eluiert. Die Behandlung des Sorbates mit der Elutionsflüssigkeit dauert etwa 30 Minuten. Nachdem die Elutionsflüssigkeit abgesaugt ist, wird die schwach ammoniakalische Lösung mit  $\text{HgCl}_2$  versetzt, wodurch die Arsensäure zum größten Teil ausfällt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird mit Essigsäure neutralisiert und danach 16 Stunden dialysiert, wobei die Aktivität sich nicht verändert.

Zur zweiten Adsorption wird die Lösung auf 5 l verdünnt und mit 50 cm<sup>3</sup> Tonerdehydrat-Emulsion (1,7 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) versetzt. Die Elution wird dialysiert, und zwar zuerst gegen reines Wasser,

<sup>1)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 453; vgl. Willstätter und Wassermann: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 123, S. 181. 1922.



danach gegen Wasser, das durch Zusatz von Salpetersäure schwach angesäuert ist ( $p_h = 3,5$ ). Nach 24stündiger Dialyse wird die Lösung mit Kieselgur behandelt, dann abfiltriert, nochmals 48 Stunden zuerst gegen angesäuertes Wasser ( $p_h = 3,5$ ) und schließlich 48 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert. Nach insgesamt 6tägiger Dialyse und Behandlung mit Kieselgur sank die Aktivität nur um 10%.

Methoden nach Willstätter und Mitarbeitern. Eine Einheitsvorschrift zur Darstellung der Saccharase ist von Willstätter nicht gegeben worden. Jedes der verschiedenen, nacheinander beschriebenen Verfahren hat Vorzüge und Nachteile. Je nach der Wahl der Methode hat es der Untersucher in der Hand, Präparate mit oder ohne Gehalt an Hefegummi, mit oder ohne Eiweißgehalt, mit oder ohne Tryptophan und Tyrosingehalt zu gewinnen. Das Prinzip der Willstätterschen Methoden ist, die geeigneten Bedingungen auszuprobieren (Säuregrad, Temperatur, Vorbehandlung der Adsorbentien, Abscheidung oder Belassung störender resp. fördernder Begleitstoffe), unter denen mit möglichst wenig Adsorbens ein Maximum an Ferment adsorbiert wird.

Je nach der Verwendung a) gealterter oder b) frischer Hefautolysate verwendet Willstätter hauptsächlich zwei Methoden, von denen je ein Beispiel folgen soll<sup>1)</sup> 2).

Die Hefe wird mit der gleichen Menge Wasser versetzt und unter Toluolzusatz autolysiert. Das Autolysat wird mehrere Monate altern gelassen (4—6 $\frac{1}{2}$  Monate). Nach dem Vorgang von Euler und Josephson wird das Autolysat mit der gleichen Menge 95 proz. Alkohols gefällt. Der Niederschlag wird mit Wasser kurz geschüttelt, wobei er sich löst; noch geeigneter ist 0,06 proz. Ammoniak. Die Lösung wird mit Essigsäure angesäuert (zu  $\frac{1}{3}$ — $\frac{3}{4}$  n) und aus ihr das Ferment mit Zettlitzer Kaolin (pro l Flüssigkeit 1 g) adsorbiert, das Adsorbat so schnell getrennt, daß das Enzym höchstens 20 Minuten der Säure preisgegeben wird. Mit 0,4 proz. Dinatriumphosphatlösung wird alsdann eluiert. Die so erhaltene Lösung wird 4 Tage lang durch sogenannte Fischblasen dialysiert und dann bis zur Stromstärke von 0,1 Milliampere elektrodialysiert. Der Dialysatorinhalt wird auf 1 l pro S.-E (s. u.) und einen Gehalt von  $\frac{1}{20}$ -n-Essigsäure gebracht. Zur Adsorption wird jetzt von dem Tonerdepräparat B (s. S. 141) eingetragen. Die Suspension wird mit Ammoniak auf ein  $p_h = 5,5$  gebracht und durch gehärtete

<sup>1)</sup> Nach Willstätter u. Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 193. 1924.

<sup>2)</sup> Willstätter u. Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 257. 1925.

Filter gesaugt. Mit 0,4proz. Dinatriumphosphat wird eluiert, 3 Tage dialysiert und fünf Viertelstunden elektrodialysiert.

Ein Beispiel der Fraktionierung mit gealtertem Autolysat<sup>1)</sup>:

1,12 l Autolysat, 26 Monate alt; 4,9 S.-E.	1,24 l Autolysat, 28 Monate alt; 6,02 S.-E.	
↓	↓	
Alkoholfällung, Elution durch Wasser, 3,77 S.-E.	Alkoholfällung, Elution durch Wasser, 4,65 S.-E.	
-----		
Adsorbiert aus $\frac{1}{3}$ essigsaurer Lösung mit Kaolin (A.-W. 0,27), 8,00 S.-E.		
↓		
Elution durch Ammoniak, 5,46 S.-E.		
↓		
Von 4,75 S.-E. in $\frac{1}{20}$ -n-Essigs. ads. m. Tonerde B 2,03 S.-E.	ferner ads. 0,92 S.-E.	bei Neutr. ausgefl. aus Restlösung 1,8 S.-E.
↓	↓	↓
Rasche Elut. d. Phosph. 0,67 S.-E.	Elut. d. Phosph. 0,51 S.-E.	Rasche Elut. d. Phosphat 0,46 S.-E.
↓	↓	↓
Eingeengt im Vak.; dial. mit 80% Verl. 0,135 S.-E.		Eing. dial. 0,415 S.-E.

Verarbeitung frischer Hefeautolysate. Mehrere Kilo frischer Hefe, die man zweckmäßig vorher einige Tage in 2proz. Zuckerlösung unter Zusatz von Nährsalzen<sup>2)</sup> und bei dauernder Durchlüftung auf 30° gehalten hat, werden mit 60 cm<sup>3</sup> Chloro-

<sup>1)</sup> Willstätter u. Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 217. 1923.

<sup>2)</sup> Vgl. Euler, H. v. u. O. Svanberg: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 107, S. 269. 1919 (S. 286). Bd. 109, S. 65. 1920. — Euler, H. v. u. B. af Ugglas: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 70, S. 279. 1910.

Beispiel zur Vorbehandlung einer Unterhefe: 75 Liter der benutzten Hefe wurde mit 500 Liter Wasser von 25° in einem 700 Liter fassenden und mit Rührpropeller versehenen Maischbottich gemischt. Die Hefe konnte sich während 20 Stunden absetzen, worauf das Waschwasser mittels Heber entfernt wurde. Die Hefe wurde nun in einen 500 Liter fassenden Bottich mit Wasser von 27° übergespült. In diesem Bottich wurde unter Umrühren folgende Lösung zugesetzt: 0,1 kg MgSO<sub>4</sub>, 1,0 kg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 kg NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 kg NH<sub>4</sub>Cl, 0,05 kg K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Hefenwasser aus  $\frac{1}{2}$  kg Trockenhefe, 10 kg Invertzucker. Auf 10 Liter aufgefüllt. — Diese Lösung wurde in drei Portionen an einem Tag in 4—5 Stunden Zwischenraum zugesetzt; die Maische wurde während 12 Gärstunden zwischen 24 und 27° gehalten. Nachdem sich die Hefe während 24 Stunden abgesetzt hatte, wurde die Maische mittels Heber entfernt, die Hefe wurde quantitativ gesammelt und mittels Handpresse abgepreßt. (Euler und Svanberg: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 107, S. 286.)

Oder man schwemmt nach Euler u. Svanberg: (Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 106, S. 201) 1 g der Hefe (Unterhefe) in folgender Lösung auf: 0,025 g MgSO<sub>4</sub>, 0,05 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (event. 1,0 g Asparagin), 2 g Rohrzucker auf 100 ccm Wasser; nach 40stündiger Vorbehandlung bei ca. 27° wird abdekantiert.

form pro kg frische Hefe mittels starker Holzstäbe innig gemischt und geknetet.

Nach 10—20 Minuten ist die Masse verflüssigt, darauf versetzt man mit dem gleichen Gewicht Wasser und neutralisiert unter ständigem Rühren mit verdünntem Ammoniak bis zum  $p_h$  6,5—7,0 (Lackmusneutralität). Während die Autolyse der Flüssigkeit bei dauernder Bewegung durch einen Rührer weitergeht, wird in kurzen Abständen die gebildete Säure weiter wie vorher neutralisiert. Nach 6—8 Stunden ist die Säurebildung beendet oder sehr verlangsamt. Nach gewöhnlich 48 Stunden ist alles Invertin aus den Zellen freigelegt. Das Autolysat wird in einer großen Zentrifuge von den Heferückständen befreit und die Flüssigkeit durch schnelles Filtrieren unter Zusatz von etwas Kieselgur auf einer Reihe großer Filter vollends geklärt. Die Fällung durch Alkohol ist unentbehrlich, um die frischen Neutralautolysate für die Kaolinadsorption geeignet zu machen. Die dabei entstehenden Enzymverluste sind zu vermeiden, wenn die Fällung aus angesäuerter Lösung (durch Zusatz von primärem Phosphat oder besser mit Essigsäure bis zur beginnenden Eiweißtrübung) bei  $p_h$  4,5—4,8 vorgenommen wird. Man zentrifugiert von dem unlöslichen Anteil scharf ab und klärt die Lösung, wenn sie nicht ganz klar ist, durch Zusatz von Kieselgur und Filtrieren.

Darauf wird die Lösung mit Wasser und 3-n-Essigsäure verdünnt und mit Salzsäure behandeltem Kaolin adsorbiert (s. S. 142, 67 g für 10 S.-E.; in 500 cm<sup>3</sup> n/2-Essigsäure für 1 S.-E.). Die Suspension wird so rasch wie möglich auf einer breiten Steinzeugnutsche mit doppelter Lage Filtrierpapier abgesaugt, was nicht mehr als 5 Minuten dauern soll. Nach dem Auswaschen wird das Adsorbat in Porzellanschalen eingetragen und zur Elution mit 1,5 l 0,05proz. Ammoniak verrührt. Die Elution wird auf mehreren Nutschen durch gehärtete Filter gesaugt und mit Essigsäure neutralisiert. Die gesamte Flüssigkeitsmenge wird im Vakuum bei 13 bis 14<sup>0</sup> auf ein Volumen von 30—35 S.-E. in 1 l eingedampft. Zur Eiweißausfällung wird die Lösung in tunlichst vielen Portionen mit 20proz. CaCl<sub>2</sub>-Lösung (4 cm<sup>3</sup> pro 1 S.-E.) und mit n/2-Schwefelsäure versetzt (die nötige Menge muß wegen der starken Säureempfindlichkeit des Invertins ausprobiert werden, indem man zu 5 cm<sup>3</sup> der eingeengten Elution 1 cm<sup>3</sup> 20proz. CaCl<sub>2</sub>-Lösung gibt und die Menge Schwefelsäure ausprobiert, die genügt, um alles Ca zu binden). Beim H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Zusatz entsteht eine dichte, sich zusammenballende Proteinfällung. Mit der Zentrifuge wird die Enzymlösung vom Niederschlag getrennt und spätestens 5 Minuten nach Versuchsbeginn mit einer

kleinen Mengen gefällten Calciumcarbonats neutralisiert. Die Lösung wird im Vakuum eingengt und zwei Tage dialysiert.

Die weitere Reinigung kann in fraktionierter Tonerdeadsorption erfolgen. Durch unvollständige Adsorption wird ein Teil des Enzyms mit dem größten Teil der Ballaststoffe entfernt, und die Restlösung wird für sich weiter verarbeitet (Voradsorption). Zumeist wurde die Hauptmenge (80—90<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) des Enzyms aufgenommen und vollständig oder fraktionsweise eluiert. Die maximale Adsorption wurde bei  $p_h$  5 gefunden. Man arbeitet in  $1/_{1000}$ -n-Essigsäure und zuerst z. B. mit 250 cm<sup>3</sup> pro S.-E. Bei höherem Reinheitsgrad ist hingegen der Adsorptionswert in konzentrierter Lösung größer (1 E. in 50 cm<sup>3</sup>).

Nach der Reinigung durch Voradsorption trägt man die vorher ausgetastete Menge Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in ca.  $1/_{40}$  des Volumens an Flüssigkeit auf einmal unter heftigem Umschütteln ein. Die Restlösung wird vom Adsorbat abzentrifugiert. Die Adsorbate werden, um sie auszuwaschen, sorgfältig mit destilliertem Wasser verrührt und die Tonerde durch Zentrifugieren vom Waschwasser abgetrennt. Hierauf wird in Fraktionen eluiert, und zwar ein kleiner Teil mit 0,05proz. Ammoniak und die Hauptmenge durch zweimalige Behandlung mit 0,5proz. Diammonphosphat. Die vereinigten Phosphatelutionen werden im Vakuum auf ein kleines Volumen eingengt und durch dreitägige Dialyse von Elektrolyten befreit, danach noch elektrodialysiert.

Dieser Voradsorption folgen noch meistens zwei weitere Adsorptionen in gleicher Weise.

Beispiel<sup>1)</sup> der planmäßigen Tonerdeadsorption (Präparat C, S. 141): Angewandt 58 E. vom S.-W. 108 nach Kaolinadsorption und Eiweißfällung.

Voradsorption (4,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> adsorbiert) in Verdünnung 1 E. in 200 cm<sup>3</sup>, neutral mit 0,6 g, Restlösung 56,7 E.

Voradsorption (10,1 <sup>0</sup>/<sub>0</sub>) unter denselben Bedingungen mit 0,6 g, Restlösung 50,8 E. weiter verarbeitet 49 E.

I. Adsorption: n/1000 Essigsäure, 1 E. in 250 cm<sup>3</sup> mit 0,95 g bei A.-W. 41,2. Elution (nach Vorelution von 2,25 E mit NH<sub>3</sub>) mit Phosphatlösung, eingedampft, dialysiert, 35,3 E.

S.-W. 2,27, weiter verarbeitet 25,5 E.

Voradsorption (7,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) n/1000 Essigsäure, 1 E. in 55 cm<sup>3</sup> mit 0,053 g bei A.-W. 39; el. S.-W. 0,7. Restlösung 23,7 E.

II. Adsorption: n/1000 Essigsäure. 1 E. in 63 cm<sup>3</sup>, mit 0,182 g bei A.-W. 115. Elution mit Phosphatlösung 17,4 E. (83<sup>0</sup>/<sub>0</sub>), nach

<sup>1)</sup> Willstätter und Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 288. 1924.

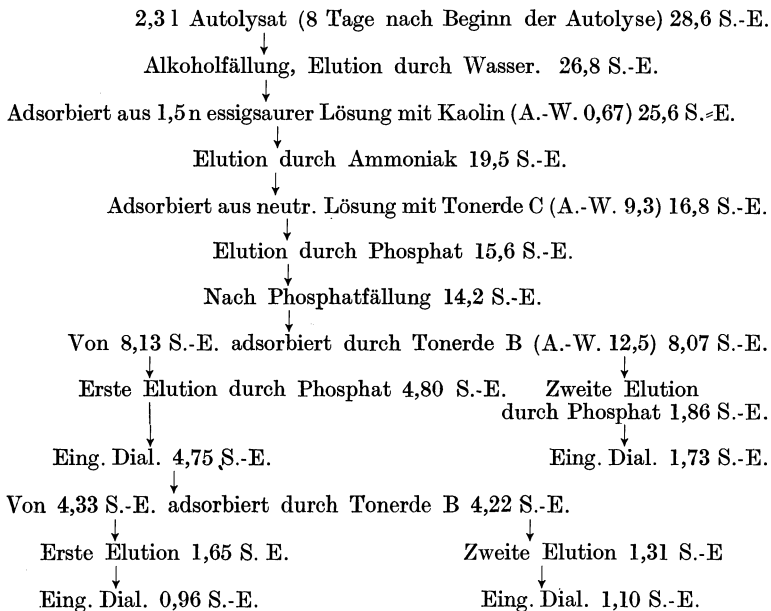
Dialysieren 16,9 E. S.-W. 3,57; nach 8 Tagen 2,76, weiter verarbeitet 12,3 E. Voradsorption (17<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) n/1000 Essigsäure, 1 E. in 50 cm<sup>3</sup> mit 0,01 g bei A.-W. 210, mit Adsorption von 2,1 E. zerstört 71<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, Restlösung 10,2 E.

III. Adsorption: n/1000 Essigsäure, 1 E. in 61, mit 0,0053 g bei A.-W. 162. Elution 8,2 E (98<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) nach Dialyse 8,2 E. filtriert von etwas Tonerde, 7,4 E. S.-W. 4,75.

Weitere Reinigung gelang nicht mehr.

Folgende Tabelle<sup>1)</sup> gibt ein weiteres Beispiel für die Reinigung der Invertinpräparate.

Fraktionierungsversuch mit Invertin aus frischem Autolysat.



Nach den letzten Untersuchungen von Willstätter, Schneider und Wenzel<sup>2)</sup> ist das beste Verfahren zur Freilegung des Invertins die fraktionierte Autolyse. Sie besteht in der Abtötung der unverdünnten Hefe durch Toluol, Abtrennung des Verflüssigungssaftes und kurzdauernde Autolyse bei 30°. Es ist vorteilhaft, einige Zeit nach der vollständigen Verflüssigung, z. B. nach

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 218. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 151, S. 1. 1925.

1 Std., Wasser (gleich dem Gewicht der Hefe) zuzusetzen und die Hefesuspension mit verdünntem Ammoniak zu neutralisieren und bis zur Abtrennung nach zwei weiteren Stunden neutral zu halten. Gute Resultate werden auch erzielt, wenn man die Hefe anstatt mit Toluol durch Verreiben mit 5—10% feingepulvertem Diammonphosphat verflüssigt, oder besser mit Phosphat + Toluol. Der Puffer genügt, so daß Neutralisation mit Ammoniak nicht mehr nötig ist. Dieses Verfahren wurde entweder bei Zimmertemperatur (6—8 Std. bis zur Abtrennung) oder bei 30° (im ganzen 3 Std. bis zur Abtrennung) ausgeführt.

Das mit der doppelten oder vierfachen Wassermenge verdünnte Autolysat wird zunächst mit der Zentrifuge abgetrennt und zweckmäßig erst danach durch geringes Ansäuern mit Essigsäure von Eiweiß vollständig befreit.

Zu Präparaten von höherem Reinheitsgrade gelangt man am einfachsten durch einmalige Adsorption von Kaolin oder zweckmäßig durch Fällung mit Alkohol und einmalige Adsorption an Tonerde.

Beispiel<sup>1)</sup>: Fällung durch Alkohol. Ein frischbereitetes Autolysat (1,5 l mit 20,9 S.-E. Zeitwert 1,15) wurde auf 0° abgekühlt und mit 1-n-Essigsäure (5 cm<sup>3</sup>) zu  $p_h$  von ca. 5 angesäuert. Beim Vermischen mit dem gleichen Volumen auf —20° gekühlten Alkohols fiel eine geringe Menge Niederschlag aus, der auf 2 Nutschen durch Filter, die mit einer 1 mm dicken Schicht Kieselgur bedeckt waren, abgesaugt wurde. Die vom Papier abgelöste Kieselgur mit Wasser verrührt, lieferte eine klare Enzymlösung. — Die Invertinlösung (370 cm<sup>3</sup>) wurde auf 92 cm<sup>3</sup> eingengt. Bei dieser hohen Konzentration wurden mit 0,40 g Tonerde (in 40 cm<sup>3</sup> Wasser) 18,7 E. adsorbiert. Das dreimal gewaschene Adsorbat lieferte in 0,5 l Wasser suspendiert beim Versetzen mit 4 g Diammonphosphat und Umschütteln in 5 Min. eine Elution, die 13 S. E. enthielt.

Eine weitere Reinigung gelingt durch Fällung durch Tannin in der Kälte. Ein Beispiel möge das Tanninverfahren schildern<sup>2)</sup>.

Die Fermentlösung mit 2,5 S.-E. wurde auf 3,4 cm<sup>3</sup> eingengt, auf 0° abgekühlt; auch die Lösung von 0,82 g Tannin in 3 cm<sup>3</sup> Wasser stand in Eis. Der Becher einer Zentrifuge wurde nun mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung von —15° gefüllt und darin mit Korkstücken ein kleines Zentrifugenglas befestigt. In diesem wurde die Fällung vorgenommen, um sofort zu zentrifugieren. Der Niederschlag von zäher Konsistenz wurde mit Wasser von 0° verrührt. Die trübe Flüssigkeit enthielt 1,64 S.-E., die Restlösung 0,14 S.-E. —

<sup>1)</sup> l. c. S. 12.    <sup>2)</sup> l. c. S. 13.

Mit Tonerde wurden bei  $0^{\circ}$  1,48 S.-E. adsorbiert und mit Diammonphosphat 1,46 S. E. eluiert.

Durch teilweise Bildung eines adsorbierend wirkenden Niederschlages von Bleiphosphat in den Invertinlösungen gelingt es, inaktiviertes Ferment von aktivem abzutrennen. Die ersten Fraktionen des Phosphatniederschlages enthalten das weniger aktive Enzym. Der Niederschlag wird so erzeugt, daß man für einen gewissen Anteil des Fermentes die ausprobierte Menge von Ammonphosphat in die konzentrierte Invertinlösung aus der Bürette einfließen läßt, sodann aus einer zweiten unter heftigem Schütteln die äquivalente Menge Bleiacetat.

#### Maße für die Konzentration des Invertins.

Als Maße werden gewöhnlich die folgenden benutzt.

1. Der „Zeitwert“ nach O. Sullivan und Tompson<sup>1)</sup>. Er gibt die in Minuten gemessene Zeit  $t$  an, die 0,05 g getrocknete Hefe (oder der dieser Menge entsprechende Hefeauszug) oder 0,05 g Enzympräparat in  $5 \text{ cm}^3$  0,5-n- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung ( $p_h$  4,5) aufgeschwemmt oder gelöst, brauchen, um zu  $20 \text{ cm}^3$  20proz. Rohrzuckerlösung hinzugefügt, diese bei  $15,5^{\circ}$  so weit zu spalten, daß nach Aufhebung der Multirotation durch Soda die Drehung bei Na-Licht  $0^{\circ}$  beträgt („Normalbedingungen“). R. Willstätter und F. Racke charakterisieren den Invertingehalt von Hefeauszügen 1. durch den „Zeitwert bezogen auf Hefe“, wobei die 0,05 g getrockneter Hefe entsprechende Menge des Auszuges unter den „Normalbedingungen“ auf die Zuckerlösung einwirkt. Bezieht man den Zeitwert der Extrakte auf den der verarbeiteten Hefe, so gewinnt man ein Maß für die Ausbeute an Ferment. 2. durch den „Zeitwert bezogen auf Trockengewicht“, der sich auf 0,05 g Trockenrückstand des Extraktes sowie beliebiger Invertinlösungen bezieht.

Praktisch wird die Zeitwertbestimmung so ausgeführt<sup>2)</sup>, daß man die pufferhaltige Zuckerlösung mit etwa so viel Invertinlösung auf  $100 \text{ cm}^3$  bringt, daß die Hydrolyse bis zur Nulldrehung 60—180 Minuten erfordert. Zwischen 50—75%<sub>0</sub> Spaltung werden  $25 \text{ cm}^3$  des Reaktionsgemisches in ein mit  $5 \text{ cm}^3$  2-n-Soda beschicktes Reagensglas eingetragen, das mindestens 15 Minuten im Thermostaten von  $20^{\circ}$  bleibt. Der Zeit- (Minuten-) Wert  $\pm 0 = t$  Min. wird entweder graphisch

<sup>1)</sup> Sullivan, O. u. Tompson: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 75, S. 834, 1890 zit. Oppenheimer-Kuhn: Die Fermente, S. 253.

<sup>2)</sup> Willstätter u. F. Racke: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1. 1920/21.

ermittelt, oder man berechnet  $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$  und daraus die Nulldrehungszeit aus der Beziehung Reaktionskonstante  $\times$  Nulldrehungszeit = 0,619 (für 20°); für 15,5° = 0,597; für 18° = 0,608; für 22° = 0,629.

Der Vergleichszeitwert für Invertin gibt an, wieviel Minuten 0,5 g trockene Hefe oder Präparat brauchen, um 1,1875 Rohrzucker in 25 cm<sup>3</sup> Lösung bei  $p_h$  4,5 und 30° zu 50% zu spalten<sup>1)</sup>. Der Vergleichszeitwert dient zum Vergleich der Wirkungen der Hefe und von Fermentpräparaten auf verschiedene Zuckerarten und Glykoside. Er bezieht sich auf die für jede Hydrolyse angebbare Zeit, die für den Umsatz von 50% des vorhandenen Substrates nötig ist.

2. Der „Saccharasewert“ (S.-W.) nach Willstätter und Kuhn<sup>2)</sup> stellt das Reziproke des Zeitwerts nach O. Sullivan und Tompson dar.

3. Die „Inversionsfähigkeit“ (If.) nach v. Euler und Svanberg<sup>3)</sup> wird definiert als

$$\text{If.} = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{g \text{ Präparat}} \quad \text{bzw.} \quad \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{g \text{ Trockensubstanz}},$$

wo  $k$  die Reaktionskonstante erster Ordnung bezeichnet;  $g$  Zucker ist die bei Beginn der Inversion ursprünglich anwesende Rohrzucker menge,  $g$  Präparat ist die Menge des angewandten Fermentpräparates bzw. das Trockengewicht der zur Inversionsbestimmung angewandten Fermentlösung. Aus dem O. Sullivan-Tompsonschen Zeitwert

$$0^{\circ} = t \text{ Minuten}$$

(berechnet für 4 g Rohrzucker und 0,05 g Präparat) ergibt sich für If. für 18°

$$\text{If.} = \frac{46 \cdot 176}{t}.$$

Denn es ist bei 18°

$$\alpha_{\max} = R_{\max}(0,44 - 18 \cdot 0,005) = 0,36 R_{\max}.$$

Die Inversionskonstante wird berechnet nach der Gleichung

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{R + \alpha}{\bar{\alpha} + L}.$$

1) Vgl. Willstätter u. Steibelt: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 111, S. 157, 169. 1920.

2) Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 509. 1923.

3) v. Euler u. Svanberg: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 106, S. 201, Bd. 107, S. 269, 1919 und v. Euler u. K. Josephson: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 1749. 1923.



Wo  $R$  die Anfangsdrehung,  $L$  die Enddrehung,  $\alpha$  die Drehung zur Zeit  $t$  bezeichnet. Dann ist  $\log 1,36/0,36 = 0,5772$  und

$$k = \frac{0,5772}{t} \text{ und If.} = \frac{0,5772 \cdot 4}{t \cdot 0,05} = \frac{46,176}{t}.$$

Die Inversionskonstante  $k$  dividiert durch die Konzentration des Enzympräparates ( $^0/0$ ) ergibt die Aktivitätszahl  $k/^0/0$ .

Das Inversionsvermögen ist nach Euler und Svanberg<sup>1)</sup>

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot g \text{ Zucker}}{\text{Zellenzahl}}.$$

Für die Umrechnung auf Inversionsfähigkeit If muß man die Zellenzahl der Hefe pro Gewichtseinheit kennen.

Da die enzymatische Inversion in der Regel nicht genau monomolekular verläuft, hat man den Mittelwert aus mehreren Beobachtungen zu nehmen. Die Zeit wird in Minuten angegeben und mit Briggschen Logarithmen gerechnet. Beispiel einer Berechnung von If. nach Euler und Josephson<sup>2)</sup>.

Inversionsmischung: 4,8 g Rohrzucker, 10 cm<sup>3</sup> 4proz. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung, 49 cm<sup>3</sup> Wasser, 1 cm<sup>3</sup> Saccharaselösung. Bei den in der folgenden Tabelle angegebenen Zeiten wurden 10 cm<sup>3</sup> Mischung in 10 cm<sup>3</sup> 5proz. Sodalösung einpipettiert, wodurch die Reaktion abgebrochen wurde. Die Lösungen wurden darauf im 1-dm-Rohr polarisiert.

Das Trockengewicht der Enzymlösung wurde durch Eindampfen einer Probe von 5 cm<sup>3</sup> bestimmt. Gefundenes Trockengewicht 1,44 mg. Also enthält 1 cm<sup>3</sup> 0,288 mg.

Min.	Drehung	$K \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$
0	2,65		Mittel
22	1,00	122	
28	0,62	130	132
33	0,37	133	
40	0,04	142	

Hieraus berechnet sich:

$$\text{If.} = \frac{132 \cdot 4,8}{2 \cdot 88} = 220.$$

4. Die Saccharaseeinheit (S.-E.) nach Willstätter und Kuhn<sup>3)</sup> als Maß für die Invertin-Mengen wird definiert als die Enzymmenge in 50 mg invertinhaltiger Substanz vom Zeitwert 1 unter den Bedingungen von O. Sullivan und Tompson.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 106, S. 201, 1919.

<sup>2)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 1749, 1923.

<sup>3)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 509, 1923.

Über Darmsaccharase (aus Schweine- und Menschendarm) vergleiche Euler und Svanberg<sup>1</sup>). — Zur Untersuchung kommt der fein zerschnittene Darm oder dessen Glycerinextrakt.

Bestimmung der Saccharase vgl. S. 144.

### Maltase.

Das Ferment katalysiert die Spaltung von Maltose in zwei Mol Traubenzucker. Es ist eine  $\alpha$ -Glucosidase.

Darstellung der Maltase. E. Fischer benutzte bei seinen Untersuchungen<sup>2</sup>) wässrige mit Toluol versetzte Extrakte der vorher scharf getrockneten Bierhefe.

Darstellung aus Hefe nach Willstätter, Oppenheimer und Steibelt<sup>3</sup>). Eine so weitgehende Reinigung des Ferments wie z. B. bei der Saccharase ist bei der Maltase noch nicht geglückt. Wichtig ist es, die bei der Autolyse der Hefen entstehenden Säuren zu neutralisieren.

Beispiel: 88 g gewaschene und abgepreßte untergärrige Hefe (die Autoren benutzten Hefen der Löwenbrauerei in München) wurden unter Zusatz von Toluol mit 132 cm<sup>3</sup> Wasser (entsprechend 20 g Trockenhefe + 200 cm<sup>3</sup> Wasser) angeschüttelt. Die Flüssigkeit reagierte zunächst neutral, eine deutlich saure Reaktion trat mitunter erst nach 50, gelegentlich aber auch schon nach 5—6 Minuten auf. Am besten ist es, häufig die neutrale Reaktion auf Lackmus durch vorsichtigen Zusatz von verdünntem 1proz. Ammoniak herzustellen. Bequem und annähernd ebenso günstig ist es, die Flüssigkeit durch Zusatz von Magnesiumcarbonat konstant bei fast neutraler Reaktion zu erhalten. — Um Maltase aus getrockneter Hefe zu bereiten, ist es unnötig, die Hefe durch stufenweises langsames Erhitzen bis auf 100° oder durch Aufbewahren im Vakuum über Schwefelsäure vorzubereiten. Lufttrockene Hefe gibt dieselbe Ausbeute. Es werden z. B. 20 g Trockenhefe mit 200 cm<sup>3</sup> Wasser und Toluol angeschüttelt; die sauer reagierende Flüssigkeit mit 1proz. Ammoniak neutralisiert.

Ein weiteres Verfahren von Willstätter und Steibelt<sup>4</sup>) zeigt folgendes Beispiel: 11 g Hefe werden im Becherglas mit 1 cm<sup>3</sup> Essigester versetzt und mit einem Glasstab 4—6 Minuten lang verrieben, bis die Verflüssigung vollständig geworden ist. Darauf wird die Hefe mit 20 cm<sup>3</sup> Wasser durchgerührt und alsbald tropfenweise mit n/10-Ammoniak unter stetigem Rühren

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 43. 1921.

<sup>2</sup>) Ber. d. chem. Ges. Bd. 28, S. 1433. 1895.

<sup>3</sup>) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 110, S. 232. 1920.

<sup>4</sup>) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 111, S. 168. 1921.

bis zur neutralen Reaktion versetzt, die man durch Tüpfeln auf hellblaues Lackmuspapier mit Vergleichsproben von destilliertem Wasser feststellt; man wartet noch 10 Minuten und gibt bei evtl. wieder eingetretener Säuerung von neuem n/10-Ammoniak bis zur neutralen Reaktion hinzu. Zu Versuchen benutzt man diese Hefesuspension, die mit Wasser verdünnt wird.

Kaolin adsorbiert Maltase, aber sie geht im Adsorbat zugrunde. Aus Tonerdeadsorbaten (in denen die Maltase weiter wirkt), läßt sich Maltase mit Maltoselösungen nur bei gleichzeitigem Zusatz von Phosphatmischung ( $p_h$  6,8) reichlich eluieren<sup>1)</sup>.

Die Wirksamkeit der Maltaselösungen wird festgestellt, indem man die Zeit in Minuten bestimmt, die 1 g getrocknete Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung braucht, um bei 30° 2,5 g Maltose (Hydrat) zur Hälfte zu hydrolysieren, wenn diese 30 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  und 22,5 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $p_h$  6,8) in 50 cm<sup>3</sup> enthalten<sup>2)</sup>.

In neueren Untersuchungen ist Willstätter und Bamann<sup>3)</sup> eine vollständige Trennung von Maltase und Saccharase auf Grund folgender Befunde gelungen. Das kurz gealterte Tonerdegel  $\text{Al}(\text{OH})_3$  ist in seiner auswählenden Adsorptionswirkung auf Gemische von Maltase und Saccharase dem frischen Gel weit überlegen, und dieses wird vom Gel der Formel  $\text{AlO}_2\text{H}$  erheblich übertroffen. Diese neuen Hydrogele vermögen nun zum Unterschied von den gewöhnlichen Tonerdesorten die Maltase reichlich, die Saccharase jedoch nur spärlich aus den Autolysaten zu adsorbieren. — Weiterhin wurde die auswählende Adsorption durch eine Methode der auswählenden Elution aus den Fermentadsorbaten ergänzt. Aus den Tonerdeadsorbaten werden Maltase wie Saccharase durch schwach alkalisches Phosphat eluiert, auch noch durch Phosphatmischung von  $p_h = 6,8$ ; von primärem Alkaliphosphat jedoch wird die Saccharase fast allein eluiert, und zwar vollständig, während der größte Teil der Maltase enzymatisch einheitlich im Adsorbat zurückbleibt und daraus gewonnen werden kann.

Folgende Beispiele seien gegeben:

1. Befreiung der Saccharase von der Maltase. In 10 cm<sup>3</sup> kaltes Hefeautolysat wurde die ebenfalls auf 0° gekühlte Suspension des kurz gealterten Tonerdegels (entsprechend 0,20 g

<sup>1)</sup> Vgl. Willstätter, R. u. R. Kuhn: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 116, S. 53. 1921.

<sup>2)</sup> Willstätter, R., Fr. Oppenheimer u. W. Steibelt: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 110, S. 233. 1920. Vgl. auch R. Willstätter u. W. Steibelt: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 201. 1921.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 151, S. 273. 1925.

$\text{Al}_2\text{O}_3$ ) eingetragen und nach Durchschütteln die Restlösung vom Adsorbat durch Zentrifugieren getrennt. Das Adsorbat wird in der Zentrifuge einmal mit Eiswasser gewaschen. Die Restlösung ist so gut wie frei von Maltase; ihr Gehalt an Saccharase belief sich auf 81,9% der angewandten Menge.

2. Befreiung der Maltase von Saccharase. Die Abtrennung der Saccharase aus dem Hefeautolysat wurde mit dem Gel  $\text{AlO}_2\text{H}$  ausgeführt. (Auf  $10\text{ cm}^3$  Autolysat 0,64 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  entsprechend.) Das mit Wasser von  $0^\circ$  ausgewaschene Adsorbat ist so gut wie saccharasefrei; die Restlösung enthielt noch ungefähr  $\frac{1}{3}$  der angewandten Maltase. Vorteilhaft ist es, die Adsorption in mehreren Anteilen vorzunehmen.

3. Trennung von Maltase und Saccharase durch auswählende Elution. Bei Anwendung von primärem Phosphat als Eluens läßt sich die Saccharase aus dem Tonerdeadsorbat auch bei  $0^\circ$  eluieren, während die Hauptmenge der Maltase im Adsorbat zurückbleibt, so daß sie nachher durch Diammonphosphat frei von Saccharase eluiert werden kann.

Bestimmung der Maltase vgl. S. 162.

### Emulsin.

Emulsin muß als ein Fermentgemenge betrachtet werden. Die am längsten bekannte Wirkung des Emulsins wird durch 3 Fermente bedingt, die Amygdalin in 2 Mol  $\beta$ -Glucose, Benzaldehyd und Blausäure spalten.

Die Spaltung des Amygdalins geht so vor sich, daß zuerst die Amygdalase die Spaltung des Amygdalins in Mandelsäurenitrilglucosid (Prunasin) und Glucose bewirkt. Dann wird durch die  $\beta$ -Glucosidase (Prunase) das 2. Mol Glucose abgetrennt. Übrig bleibt das Benzaldehydcyanhydrin, von dem durch ein drittes Ferment, Benzcyanase oder Oxynitrilase, die Blausäure abgetrennt wird.

Auch andere  $\beta$ -Glucoside werden von  $\beta$ -Glucosidase gespalten (Salicin, Helicin u. a.)<sup>1)</sup>.

Darstellung nach Willstätter und Csányi<sup>2)</sup>: Bittere Mandeln werden zur Enthäutung eine Viertelstunde in Wasser von  $60$ — $70^\circ$  erwärmt. Sie werden oberflächlich an der Luft getrocknet, in der Mandelmühle zerkleinert und in der hydraulischen Presse zum größten Teil vom Öl befreit. Darauf werden sie mit der dreifachen Menge Äther in einer Flasche extrahiert, nach dem Absaugen

<sup>1)</sup> Willstätter, R. u. G. Oppenheimer: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 121, S. 183. 1922.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 147, S. 173. 1921.

in der Walzmühle gemahlen und nochmals mit der doppelten Menge Äther ausgezogen, abgesaugt und nachgewaschen. Das in einem warmen Luftstrom getrocknete Material wird in einer Siebmühle aufs feinste gemahlen. Das Pulver wird jeweils für die Bestimmungen im Exsiccator getrocknet. Beim Aufbewahren nimmt seine enzymatische Kraft ab; z. B. in einem halben Jahre um 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

100 g Mandelpulver werden in einer Flasche mit 250 cm<sup>3</sup> n/10-Ammoniak verrührt, darauf mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser 5 Std. lang mit der Maschine geschüttelt. Den ammoniakalischen Auszug trennt man mittels der Zentrifuge von den Rückständen, um diese sogleich in den Zentrifugengläsern wieder mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser unter Zusatz von 10 cm<sup>3</sup> n/10 NH<sub>3</sub> anzurühren, von neuem zu zentrifugieren und ebenso einen dritten Auszug zu bereiten, abermals, falls die alkalische Reaktion verschwunden ist, unter Zusatz von einigen cm<sup>3</sup> Ammoniak. Die vereinigten Auszüge, etwa 1/2 l, enthalten 60<sup>0</sup>/<sub>0</sub> der Trockensubstanz der Mandeln. Ein Teil der Eiweißstoffe wird jetzt mit Essigsäure (300 cm<sup>3</sup> n/10 oder 60 cm<sup>3</sup> n/2) ausgefällt und abfiltriert; der Niederschlag enthält 5—8<sup>0</sup>/<sub>0</sub> vom Emulsin. Das Filtrat wird mit der 4fachen Menge Sprit gefällt, der rein weiße Niederschlag mittels der Zentrifuge getrennt und mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen. Das Pulver wird mit wenig Wasser in der Reibschale zu einem Teig angerieben, in der 30fachen Menge Wasser gelöst, dann wird vom Ungelösten abzentrifugiert, zum zweiten Male mit Alkohol gefällt, nötigenfalls zum Zweck der besseren Ausflockung unter Zusatz von einer Spur Calciumchlorid. Das Präparat ist in Wasser klar löslich.

Die Emulsinhandelspräparate sind nach Willstätter zwar nicht so wirksam, aber haltbarer.

Nach K. Josephson<sup>1)</sup> ist es vorteilhafter, nicht mit der vierfachen, sondern mit der dreifachen Menge Alkohol zu fällen. Durch Dialyse werden die Reinheitsgrade der Fermentlösungen etwas verbessert, es treten aber dabei starke Aktivitätsverluste ein.

Darstellung von Emulsin aus Pflaumenkernen nach B. Helferich<sup>2)</sup>: Die zerkleinerten Kerne von *Prunus domest.* (Süßkirsche wie auch Aprikose waren nicht geeignet) werden mit 2 Gewichtsteilen Toluolwasser angerührt, 4 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt, abzentrifugiert, die nicht ganz klare Lösung nach mehreren Wochen mit etwa 1 1/2 Volumteilen der Ferment-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 117. 1925.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. 117, S. 166. 1921 u. B. Helferich, Speidel u. Toeldte: Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. 128, S. 99. 1923.

lösung Alkohol gefällt, das gefällte Präparat abzentrifugiert, mit Alkohol und Äther gewaschen, an der Luft getrocknet.

In der essigsäuren Lösung, auch in 30% Alkohol enthaltender, ist das Emulsin praktisch beständig. Gegenwart von Alkohol hemmt die Amygdalinspaltung deutlich, 10% Alkohol in der Reaktionsflüssigkeit erniedrigt die Wirkung um etwa ein Viertel.

Als Maß für die Emulsinwirkung dienen die Zeitwerte der 50 proz. Spaltung von Amygdalin, Prunasin,  $\beta$ -Methylglucosid, Lactose und Raffinose: die Anzahl Minuten, die 1 mg Emulsinpräparat oder enzymhaltige Pflanzensubstanz brauchen würde, um bei 30° und optimalem  $p_h$  50% der theoretischen Monosemenge abzuspalten in 20 cm<sup>3</sup> Lösung aus 0,1000 g Amygdalin (3 H<sub>2</sub>O enthaltend) bzw. von 0,05765 g Prunasin, 0,0793 g  $\beta$ -Methylglucosid (mit 1/2 H<sub>2</sub>O), 0,07034 g Lactose (mit 1 H<sub>2</sub>O), 0,2320 g Raffinose (mit 5 H<sub>2</sub>O). — Unter theoretischer Menge wurden verstanden 2 Mole Glucose aus Amygdalin, 1 Mol Glucose aus Prunasin,  $\beta$ -Methylglucosid, Lactose, 1 Mol Galaktose aus Raffinose. (Vgl. auch S. 139.)

Die optimale Wasserstoffzahl ist für die Hydrolyse des Amygdalins  $p_h = 6$ , für Prunasin und  $\beta$ -Methylglucosid 4,9, für Lactose 4,4 und für Raffinose 4,1 (in allen Fällen mit Acetatgemisch eingestellt).

Eine Trennung der  $\beta$ -Glucosidase vom stärkerespaltenden Ferment im Emulsin beschreibt K. Josephson<sup>1)</sup>. Die  $\beta$ -Glucosidase (geprüft auf Salicin) wird durch Tonerde fraktioniert adsorbiert und mit einer 0,75proz. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung eluiert. Die Mandelamylase befindet sich in der Restlösung.

Bestimmung des Emulsins vgl. S. 163.

### Lactase.

Lactase katalysiert die Spaltung von Milchzucker in seine Komponenten, die Glucose und die Galaktose. Auch eine Reihe von Derivaten der Lactose wird gespalten.

Darstellung. Nach Angaben von E. Fischer<sup>2)</sup> gibt weder frische, noch an der Luft getrocknete Hefe an Wasser (bei 30°, während 20 Stunden) Lactase ab, wohl aber, wenn die lufttrockene Hefe mit Glaspulver sorgfältig verrieben wird. Willstätter konnte jedoch zeigen, daß — wie bei der Maltase — diese negativen Beobachtungen auf die in der Hefe entstehende Säure zurückzuführen sind. Um ohne Trocknung der Hefe das Ferment darzustellen, verwenden Willstätter und Oppen-

<sup>1)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 58, S. 2726. 1925.

<sup>2)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 27, S. 3479 (3481). 1894.

heimer<sup>1)</sup> frische Reinkulturen von *Saccharomyces fragilis*, die mit wiederholt sterilisiertem und filtriertem Hefedekokt unter Zusatz von 7—10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Lactose bei 26<sup>0</sup> weiter gezüchtet werden. 5 g der frischen Hefe werden etwa 10 Min. mit 1 cm<sup>3</sup> Chloroform verflüssigt, dann mit 7 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt und vorsichtig mit 1,1 cm<sup>3</sup> 1proz. Ammoniaks neutralisiert. Im Verlauf der nächsten 6 Std. muß etwa sich noch bildende Säure wieder mit 1 proz. NH<sub>3</sub> vorsichtig neutralisiert werden. Nach einem, besser nach 2—3 Tagen wird die Lactaselösung abfiltriert. — Oder es wurde die lufttrockene Hefe ohne Zerkleinerung und ohne Toluolzusatz verarbeitet, indem 2 g getrockneter *S. fragilis* mit 20 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und sorgfältig (Tüpfeln auf Lakmus) mit 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Ammoniak neutralisiert wurde. Nach einem Tage wurde die Lactaselösung abzentrifugiert.

Die Lactasewirkung wurde durch den Zeitwert in Minuten gemessen, als die Zeit, die 1 g trockene Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung brauchen würde, um bei 30<sup>0</sup> und optimalem  $p_h$  (= 7) in 50 cm<sup>3</sup> Lösung 2,5 g Lactose (Hydrat) zu hydrolysieren. Als Substrat dient wasserhaltiger Milchzucker von  $[\alpha]_D = + 52,53^0$ .

Bestimmung der Lactase vgl. S. 168.

### Diastasen (Amylasen).

Unter Diastase oder Amylase versteht man ein wahrscheinlich aus mehreren Teilfermenten zusammengesetztes Enzym, das den Abbau von Stärke und Glykogen bis zur Maltose katalysiert.

Die tierischen Amylasen kommen als Zymogene vor. Sie werden durch Neutralsalze aktiviert, besonders durch Chloride. Dialysierter Pankreassaft büßt nach Bierry<sup>2)</sup> seine diastatische Wirkung vollkommen ein.

Der optimale NaCl-Zusatz ist für Pankreasamylase nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse<sup>3)</sup> 0,003—0,03 Normalität. Ein Zusatz von 0,03<sup>0</sup>/<sub>0</sub> NaCl (bei  $p_h = 6,8$ ; Phosphatpuffer) ist genügend für die ausgleichende Aktivierung. Pflanzliche Amylase wird durch Neutralsalze nicht aktiviert, da sie schon in aktivem Zustande vorliegt [Hahn, Harpuder, Michalik<sup>4)</sup>].

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 118, S. 168. 1921.

<sup>2)</sup> Bierry, H. u. J. Giaja: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 143, S. 300. 1906. — Bierry, H.: Biochem. Zeitschr. Bd. 40, S. 357, 1912.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 126, S. 143. 1923.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 71, S. 287, 302; Bd. 73, S. 10. 1921; Bd. 74, S. 217; Bd. 76, S. 227.

Bakterienamylase verhält sich wie die tierische [Avery und Cullen<sup>1)</sup>].

### Speichelamylase.

Darstellung: Man sammelt den Speichel am besten mit Hilfe von Schwämmchen [Pringsheim und Gorodiski<sup>2)</sup>].

Parotisspeichel vom Tier kann man auch leicht durch Katheterisierung des Ductus stenoianus mittels eines dünnen Gummikatheters gewinnen.

### Pankreasamylase.

Darstellung nach Willstätter, Waldschmidt, Leitz und Hesse<sup>3)</sup>:

Die Vorbehandlung der Drüsen ist die gleiche wie die bei Trypsin (siehe S. 234) geschilderte. Ausgangsmaterial ist auch hier der Glycerin-Rohauszug. Die Amylase läßt sich besonders leicht und vollständig in Lösung überführen, und zwar durch Wasser ebenso wie durch Glycerin. — Das gepulverte Trockenpankreas wird mit wasserhaltigem Glycerin (16 cm<sup>3</sup> für 1 g) unter wiederholtem Durchschütteln einige Stunden bei 30° behandelt; der mit der Zentrifuge abgetrennte Glycerinauszug enthält dann 93—98% der Amylase. Der Rohextrakt wird durch Verdünnen mit dem 5fachen Volumen Wasser geklärt, wobei ein reichlicher Niederschlag (mit sehr wenig Amylase und Trypsin) ausfällt, der abzentrifugiert wird.

Anmerkung I. Typen der verschiedenen Aluminiumhydroxydpräparate nach Willstätter<sup>4)</sup>.

1. Aluminiumhydroxyd A. Durch Fällen von Aluminiumsulfat mittels Ammoniak und darauf folgendes langes Kochen dargestellt; plastisch.

2. Aluminiumhydroxyd B, ebenso dargestellt, aber ohne längeres Kochen; plastisch.

3. Aluminiumhydroxyd C wie B, aber mit sehr verdünntem Ammoniak gefällt, feinpulverig, voluminös.

4. Aluminiumhydroxyd D; als Kaliumaluminat mit Kohlendioxyd gefällt, mikrokristallinisch, grobpulverig.

Anmerkung II. Salzsäurebehandeltes Kaolin [Willstätter und Schneider<sup>5)</sup>]. 500 g Kaolin werden mit 1,5 l reiner Salzsäure vom spez.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 32, S. 571, 582 (zit. Oppenheimer S. 693).

<sup>2)</sup> Pringsheim u. Gorodiski: Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 175. 1923. Nach Hoppe-Seyler kann man Speichel in der Weise gewinnen, daß man bei vornübergeneigtem Kopfe den Mund weit öffnet, ohne dabei irgendwelche Bewegung auszuführen; nach einiger Zeit fließt dann reiner Speichel ab, der gleich zum Versuch verwandt werden kann. (Zitiert nach Wohlgemuth, Fermentmethoden, S. 45).

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 126, S. 143 (159). 1923.

<sup>4)</sup> Willstätter: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 132 (161).

<sup>5)</sup> Willstätter u. Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 200.



Trennung von Lipase. Die Trennung gelingt mit Aluminiumhydroxyd auf Grund der stärker ausgeprägten Adsorptionsaffinität der Lipase. Der geklärte Rohauszug wird mit Essigsäure angesäuert. So z. B. [Willstätter und Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup>] wurde der durch Verdünnung mit Wasser geklärte Glycerinauszug 2930 cm<sup>3</sup> mit 30 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure angesäuert, dann mit 750 cm<sup>3</sup> Tonerdesuspension (Darstellung B), die 6,975 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> enthielt, geschüttelt und zentrifugiert. In dieser Restlösung waren 76% Amylase mit 10% Lipase. Die Lipase muß nun aus der Amylaselösung mit Tonerde vollständig entfernt werden, wofür die Hälfte des für die Adsorption der Hauptmenge angewandten Aluminiumhydroxyds genügt. — In der von der Lipase befreiten sauren Lösung unterliegt die Amylase rasch der Zersetzung, die vermieden werden kann durch Zusatz von Glycerin zu einem Gehalt von 50% oder durch Neutralisation. Man kann auch die verdünnten Lösungen bei neutraler Reaktion ohne Enzymverlust im Vakuum auf 10fache Konzentration einengen.

Die Trennung von Amylase und Trypsin läßt sich auch durch zweimalige Einwirkung von Kaolin auf die schwach essigsäure (von Alkohol freie) Lösung durchführen, wobei sich die Verluste an Amylase gewöhnlich zwischen 20 und 40% bewegen.

Beispiel zur Trennung mit Kaolin. Die von Lipase befreite Enzymlösung 200 cm<sup>3</sup> (mit 84,2 Am.-E.) wurde mit 2,3 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure angesäuert, mit der Suspension von 4,8 g elektroosmotisch gereinigtem Kaolin in 20 cm<sup>3</sup> Wasser geschüttelt und hiervon mit der Zentrifuge 210 cm<sup>3</sup> Restlösung (mit 57,2 Am.-E.) abgetrennt. Der Trypsingehalt betrug noch etwa  $\frac{2}{3}$  der angewandten Menge. — Von derselben lipasefreien Enzymlösung wurden weitere 200 cm<sup>3</sup> einer zweimaligen Behandlung mit je 4,8 g Kaolin unterworfen und 222 cm<sup>3</sup> Adsorptionsrestlösung gewonnen. Die Restlösung enthielt noch etwa 75% der angewandten

---

Gew. 1,18 gut vermischt und erwärmt, zunächst so langsam, daß es einen Tag bis zu beginnendem Kochen dauert, dann einen weiteren Tag bis zum lebhaften Sieden. Durch Verdünnen und wiederholtes Abgießen mit Wasser trennt man die eisenhaltige Lösung vom Kaolin ab und wiederholt noch dreimal diese Behandlung mit Salzsäure, so daß im ganzen 14 Tage dafür nötig sind. Das Kaolin wird schließlich mit kaltem Wasser ausgewaschen so weit, daß das Wasser fast keine saure Reaktion mehr zeigt, daß aber eine kleine Probe des Kaolins auf Lackmuspapier noch stark saure Reaktion aufweist.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 175. 1923.

Amylase und war frei von proteolytischer Wirkung. — Aus den Kaolinadsorbaten ließ sich das Trypsin mit ammoniakalischem Phosphat (100 cm<sup>3</sup> 0,6 proz. 2<sup>1</sup>/<sub>3</sub> bas. Ammonphosphat) freimachen, ohne daß es in der Elution von Amylase begleitet war. Die Adsorptionsmethode liefert demnach das diastatische Ferment als Restlösung trypsinfrei, das Trypsin als Elution aus dem Kaolin amylassfrei.

Die Amylase wird auf dieser Stufe der Reinigung noch von Tonerde adsorbiert, und zwar aus neutraler Lösung bei einem hohen (mindestens 50<sup>0</sup>/o) Gehalt an Alkohol. — Beispiel: 600 cm<sup>3</sup> der von Lipase und Trypsin befreiten, gegen Lackmus neutralisierten Lösung (mit 155,4 Am.-E.) werden mit 720 cm<sup>3</sup> 96 proz. Alkohol und mit 360 cm<sup>3</sup> Suspension der Tonerde A (10,8 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) versetzt. Dann wird rasch zentrifugiert und das Adsorbat zur Elution in Zentrifugengläsern zweimal mit je 200 cm<sup>3</sup> ammoniakalischem Phosphat angerührt (bestehend aus 114 cm<sup>3</sup> 1 proz. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 cm<sup>3</sup> n-NH<sub>3</sub> und 80 cm<sup>3</sup> 87 proz. Glycerin). Die so erhaltenen Lösungen (435 cm<sup>3</sup> mit 187 Am.-E.) werden durch 7 tägige Dialyse gegen fließendes destilliertes Wasser von Elektrolyten und von Glycerin befreit. Eine neuerliche Adsorption der eluierten Amylase unter gleichen Versuchsbedingungen gelingt nur unvollkommen.

### Leberamylase.

Man verwendet entweder Alkoholfällungen aus wässrigen Auszügen frischer Organe oder Glycerinauszüge oder Preßsäfte. Holmbergh<sup>1)</sup> extrahiert die frische zermahlene Leber mit Wasser (1000 g mit 1000 cm<sup>3</sup>) oder mit Glycerin (40 g Leberbrei mit 160 cm<sup>3</sup> 87 proz. Glycerin). Man kann auch das zerkleinerte Organ nach Wiechowski und Wiener in dünner Schicht auf Glasplatten streichen und es in einem warmen Luftstrom trocknen. Oder man stellt das Organtrockenpulver (Holmbergh) dar, indem man den Schweineleberbrei (z. B. ca. 1800 g) mit dem gleichen Gewicht (also etwa 2 l) Aceton anrührt und nach 2 Std. filtriert der Rückstand wird mit 1,5 l Aceton aufgeschlämmt und nach 30 Min. abgesaugt; darauf folgt eine Aufschlammung und Schüttelung in 1 l Aceton und 1 l Äther während 5 Min., und man wiederholt dies noch zweimal mit je 1 l Äther. Die feste Masse wird in dünner Schicht auf Filtrierpapier ausgebreitet, 2 Std. getrocknet und in der Pulvermühle zerkleinert. Die Fermentverluste sind bei dieser Behandlung sehr groß.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 79. 1923.

### Pflanzliche Amylasen.

Darstellung Nach H. Euler und O. Svanberg<sup>1)</sup>. 130 g fein-geriebenes Dörrmalz werden bei Zimmertemperatur 3 Tage mit 400 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser in Gegenwart von Toluol in einer verkorkten Flasche, die öfter geschüttelt werden muß, extrahiert. Die Aufschwemmung wird durch ein Tuch gepreßt und die noch trübe Lösung zur Klarheit filtriert. Danach wird sie 40 Std. gegen destilliertes Wasser in Kollodiumsäckchen dialysiert<sup>2)</sup>, wobei wieder durch Toluol für Keimfreiheit gesorgt wird. Die Stabilität der gelösten Amylase ist bei Zimmertemperatur zwar nicht so groß wie die der gelösten Saccharase; die Lösungen sind aber mehrere Wochen haltbar.

Die Malzamyrase wird, wie Euler fand<sup>3)</sup>, aus saurer, nicht aber aus neutraler und alkalischer Lösung von Kaolin adsorbiert. Bei Elution mit Phosphatpuffer von  $p_h$  8 erhielten H. Pringsheim, A. Genin und R. Perewosky<sup>4)</sup> die Amylase im Eluat, jedoch noch vermengt mit der Maltase des Malzes. Durch Verringerung der zur Adsorption verwandten Kaolinmenge und Beifügung von Alkohol bei der Adsorption ließ sich die Trennung vervollkommen.

Von Kryptogamen ist hauptsächlich zu nennen die japanische Kojehefe (alkoholbildende Saccharomyceten in Symbiose mit dem Schimmelpilz *Aspergillus Oryzae*), die als Takadiastase in den Handel kommt.

Bestimmung der Amylase vgl. S. 169.

### Bestimmungsmethoden.

#### Bestimmung der Saccharase.

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Methoden der Bestimmung: 1. Die Bestimmung der Menge der gebildeten reduzierenden Substanzen. 2. Die Bestimmung der Änderung der physikalischen Eigenschaften (z. B. optischen) des Ausgangsmaterials.

Glukose-Bestimmung nach Bertrand.

Prinzip<sup>5)</sup>.

Das beim Kochen mit Fehlingscher Lösung gebildete Kupferoxydul wird in einer Lösung von Ferrisulfat in Schwefelsäure gelöst und das gebildete Ferrosalz mit einer auf Ammoniumoxalat eingestellten Kaliumpermanganatlösung titriert.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 112, S. 193. 1920.

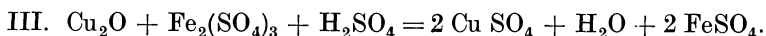
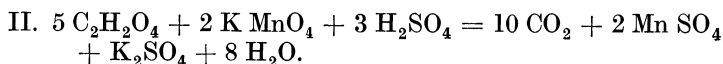
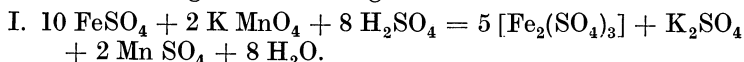
<sup>2)</sup> Vgl. hierzu Euler, H. u. O. Svanberg; Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 110, S. 177. 1920.

<sup>3)</sup> Chemie der Enzyme. 1. Teil, S. 88. 1920.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 164, S. 117. 1925.

<sup>5)</sup> Bull. de la soc. de chim. biol. Bd. 35, S. 1285. 1906. (Vgl. hierzu E. J. Lesser; Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 252. 1913.)

Erforderliche Lösungen. Lösung 1: 40 g reines kristallisiertes Kupfersulfat werden in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Lösung 2: 200 g reines Seignette-Salz, 150 g Natriumhydroxyd in Stangen werden in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Lösung 3: 50 g Ferrisulfat (das frei von Ferrosulfat sein muß, also Kaliumpermanganatlösung nicht reduzieren darf) werden mit 200 cm<sup>3</sup> konzentrierter Schwefelsäure in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Lösung 4: 5 g Kaliumpermanganat werden in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Zur Bestimmung des Titers der Permanganatlösung werden 0,250 g Ammoniumoxalat im Becherglas mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser und 2 cm<sup>3</sup> konzentrierter Schwefelsäure auf 60—70° erwärmt, dann läßt man aus der Bürette so lange Kaliumpermanganat hinzulaufen, bis Rosafärbung eintritt. 1 Mol Ammoniumoxalat entspricht 2 Fe und somit 2 Cu. Ammoniumoxalat hat das Molekulargewicht 142,1 (C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O). Die Umsetzungen werden durch folgende Gleichungen erläutert:



Durch Multiplikation der für die Titration benutzten g Ammonoxalat mit

$$\frac{63,6 \times 2}{142,1} = 0,8951$$

erfährt man die g Kupfer, die den für die Titration verbrauchten cm<sup>3</sup> Kaliumpermanganatlösung entsprechen.

Zur Oxydation von 0,250 g Ammoniumoxalat werden etwa 22 cm<sup>3</sup> der Permanganatlösung verbraucht. 0,250 g Ammoniumoxalat entsprechen nach obiger Gleichung 0,2238 g Cu. Aus diesen Daten läßt sich in einfacher Weise die Cu-Menge berechnen.

Beispiel: Die Titerstellung habe ergeben, daß 22,0 cm<sup>3</sup> der Permanganatlösung zur Oxydation von 0,250 g Ammoniumoxalat erforderlich seien. Dann entspricht jeder Kubikzentimeter der Permanganatlösung 10,17 mg Cu. Bei Abweichungen des Titers ist natürlich die Berechnung entsprechend zu ändern.

Ausführung: In einen Erlenmeyer-Kolben von 150 cm<sup>3</sup> bringt man 20 cm<sup>3</sup> der zu untersuchenden Zuckerlösung (dieselbe soll höchstens 100 mg, am besten 10—90 mg Zucker enthalten), und fügt dazu je 20 cm<sup>3</sup> der Kupferlösung und der Seignettesalzlösung, erhitzt zum Kochen und läßt 3 Min., nachdem die ersten

Blasen sich gebildet, nicht zu heftig sieden. Dann nimmt man den Kolben von der Flamme und läßt das Kupferoxydul gut absitzen. Die Zucker-Kupferlösung muß nach dem Kochen noch einen Überschuß an Kupfersulfat besitzen, d. h. blau sein. Nachdem das Oxydul sich gut abgesetzt hat, bringt man die Flüssigkeit auf ein Asbestfilter<sup>1)</sup> und saugt gut ab. Es ist darauf zu achten, daß von dem Oxydulniederschlag möglichst wenig auf das Filter kommt. Nachdem die blaue Flüssigkeit abfiltriert ist, wird der Niederschlag im Kölbchen mit lauwarmem, destilliertem Wasser gewaschen und das Waschwasser auf das Filter gebracht. Dabei ist darauf zu achten, daß das Kupferoxydul stets vom Waschwasser bedeckt ist und mit der Luft wenig in Berührung kommt. Nach dem Auswaschen bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion entfernt man das Filter von der Saugflasche und wäscht diese mit destilliertem Wasser gut aus, so daß sie keine Spur von Kupfersulfat mehr enthält. Man bringt nun den Oxydulniederschlag im Kölbchen mit ca. 20 cm<sup>3</sup> der Ferrisulfatlösung (Lösung 3) in Lösung. Es bildet sich eine schön grüne Lösung. Diese wird auf das wieder auf der Saugflasche befestigte Filter gebracht und langsam durchgesaugt. Löst sich dabei nicht alles Oxydul, so gießt man noch etwas Ferrisulfatlösung nach. Kölbchen und Filter werden dann gut mit destilliertem Wasser gewaschen, um alles Oxydul in die Saugflasche zu bekommen. Man titriert nun mit der Permanganatlösung. Der Umschlag vom Grün ins Rosa ist scharf und bei natürlichem und künstlichem Licht gut zu erkennen.

Zur Berechnung des Glukosegehaltes aus dem Cu dient bestehende Tabelle. Es entspricht:

Glucose in mg	Cu in mg	Glucose in mg	Cu in mg	Glucose in mg	Cu in mg	Glucose in mg	Cu in mg
10	20,4	20	40,1	30	59,1	40	77,5
11	22,4	21	42,0	31	60,9	41	79,3
12	24,3	22	43,9	32	62,8	42	81,1
13	26,3	23	45,8	33	64,6	43	82,9
14	28,3	24	44,7	34	66,5	44	84,7
15	30,2	25	49,6	35	68,3	45	86,4
16	32,2	26	51,5	36	70,1	46	88,2
17	34,2	27	53,4	37	72,0	47	90,0
18	36,2	28	55,3	38	73,8	48	91,8
19	38,1	29	57,2	39	75,7	49	93,6

<sup>1)</sup> Die Asbestfiltrerröhrchen sind ca. 14 cm lang; der zylindrische Hauptteil ca. 6 cm lang und 17 mm breit, verjüngt sich gegen das Ende zu und setzt sich in einen birnenförmigen Teil fort, der den Asbest trägt. Jetzt wird man mit Vorteil die Glasfilter der Firma Schott anwenden.

(Fortsetzung von S. 146.)

Glucose in mg	Cu in mg	Glucose in mg	Cu in mg	Glucose in mg	Cu in mg	Glucose in mg	Cu in mg
50	95,4	63	117,9	76	139,6	89	160,4
51	97,1	64	119,6	77	141,2	90	162,0
52	98,9	65	121,3	78	142,8	91	163,6
53	100,6	66	123,0	79	144,5	92	165,2
54	102,3	67	124,7	80	146,1	93	166,7
55	104,1	68	126,4	81	147,7	94	168,3
56	105,8	69	128,1	82	149,3	95	169,8
57	107,6	70	129,8	83	150,9	96	171,4
58	109,3	71	131,4	84	152,5	97	173,1
59	111,1	72	133,1	85	154,0	98	174,6
60	112,8	73	134,7	86	155,6	99	176,2
61	114,5	74	136,3	87	157,2	100	177,8
62	116,2	75	137,9	88	158,8		

Für andere Zuckerarten sind von Bertrand ebenfalls solche Tabellen aufgestellt worden (vgl. S. 150).

Anwendungen der Bertrandschen Methodik auf kleine Zuckermengen sind u. a. von Moeckel und Frank und von L. Michaelis angegeben.

Moeckel und Frank<sup>1)</sup> geben folgende Vorschrift:

5 cm<sup>3</sup> der eiweißhaltigen Flüssigkeit (z. B. mit FNa versetztes Blut) werden in ein Meßkölbchen von 100 cm<sup>3</sup> pipettiert und bleiben, mit etwa 40 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt, einige Minuten stehen, dann entweißt man nach Rona und Michaelis mit kolloidalem Eisenhydroxyd. Man verdünnt 20 cm<sup>3</sup> des kolloidalen Eisenhydroxydes aufs Doppelte und setzt von dieser Lösung aus einer Bürette der Eiweißlösung schußweise, unter jedesmaligem Schwenken des Kölbchens, 30 cm<sup>3</sup> zu. (Diese Mengen sind für Blut angegeben. Bei eiweißärmeren Lösungen kommt man mit weniger Eisenhydroxyd aus.) Dazu fügt man pulverisiertes Seignette-Salz (ein bis zwei erbsengroßen Krystallen entsprechend), schüttelt kräftig, indem man das Kölbchen mit dem Finger verschließt.

Man wartet einige Minuten und setzt dann die restierenden 10 cm<sup>3</sup> der Eisenlösung in zwei Portionen zu, füllt bis zur Marke auf und schüttelt noch 2 Min. recht kräftig. (Durch einige Tropfen Äther läßt sich der störende Schaum entfernen.) Nach weiteren 5 Min. filtriert man entweder durch ein Faltenfilter oder zentrifugiert. Falls das Filtrat noch schwach gefärbt ist, so genügen, je nach der Intensität der Färbung, 1—3 cm<sup>3</sup> unverdünnten Eisenhydroxydes, um eine farblose, sicher eiweißfreie Lösung zu erhalten.

Mit 50 cm<sup>3</sup> des Filtrates wird die Bestimmung nach Bertrand in

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 69, S. 84. 1910; vgl. auch ebenda Bd. 65, S. 323. 1910.

einem Erlenmeyer-Kolben von 250—300 cm<sup>3</sup> ausgeführt. Als Bertrand-Lösung 1 (die Lösung von Kupfersulfat) dient am besten eine solche, die im Liter eine bestimmte Menge reinsten Traubenzuckers (etwa 0,25 g) enthält, weil dadurch die Genauigkeit der Bestimmung sich erhöht. Nach dem Kochen kühlt man rasch ab und wartet 10 Min., ehe man durch das Asbeströhrchen filtriert. Es ist vorteilhaft, den Erlenmeyer-Kolben in einen großen Trichter zu setzen, in dem ihn der Strahl der Wasserleitung umspült. Für Zuckerwerte von 10,0 bis 0,5 mg (in 50 cm<sup>3</sup>) geben Moeckel und Frank folgende Tabelle:

Cu in mg	Glucose in mg	Cu in mg	Glucose in mg
1,1	0,5	11,5	5,5
2,2	1,0	12,5	6,0
3,3	1,5	13,5	6,5
4,4	2,0	14,5	7,0
5,5	2,5	15,5	7,5
6,5	3,0	16,5	8,0
7,5	3,5	17,5	8,5
8,5	4,0	18,5	9,0
9,5	4,5	19,5	9,5
10,5	5,0	20,5	10,0

Bei der Ausrechnung sollen nicht etwa die dem Zucker-gehalt der Kupfer-Zuckerlösung entsprechenden Kubikzentimeter Permanganat von dem titrierten Permanganatwert abgezogen werden, sondern es sind zunächst die diesen beiden Permanganatzahlen zugeordneten Traubenzuckermengen auszurechnen und diese voneinander zu subtrahieren.

L. Michaelis<sup>1)</sup> kombiniert die Enteiweißung mittels Hitze und Eisenhydroxyd und die nachträgliche Zuckerbestimmung nach Bertrand nach der folgenden Vorschrift:

Man messe mit einer genauen Pipette 1 cm<sup>3</sup> (bis 2 cm<sup>3</sup>) der eiweißhaltigen Flüssigkeit (z. B. mit FNa versetztes Blut) ab und gebe sie in einen 100 cm<sup>3</sup> fassenden, birnenförmigen, gewöhnlichen Erlenmeyer-Kolben, der vorher mit genau 10 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser beschickt worden ist, wasche die Pipette durch mehrmaliges Aufziehen und Ausblasen mit diesem Wasser gut aus und entleere sie zum Schluß so vollkommen wie nur möglich. Dann fülle man die Flüssigkeit mit Wasser auf 12 cm<sup>3</sup> auf.

Nunmehr wird der Inhalt des Kolbens unter häufigem Umschwenken auf freier Flamme (über einer Schicht Asbestpapier) bis zum Sieden erhitzt und unter Umschütteln etwa 2 Sek. im Sieden erhalten, dann vom Feuer genommen, dann ganz allmählich, langsam, tropfenweise und unter lebhaftem dauerndem Umschwenken mit 7,5 cm<sup>3</sup> einer aufs 5fache verdünnten Lösung von 5proz. Liquor ferri oxydati dialysati versetzt, schließlich 0,5 cm<sup>3</sup> einer 0,5 proz. Lösung von Magnesiumsulfat zugesetzt und

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 59. S. 166 (1914).

leicht umgeschüttelt. Dann wird durch ein gewöhnliches trockenes Filter von mittlerer Größe in einen hohen Meßzylinder von  $20\text{ cm}^3$  Inhalt filtriert. Das Filtrat muß wasserklar sein und spielend leicht durchfiltrieren. Von dem Filtrat bringe man  $12,5\text{ cm}^3$  in ein Kochkölbchen von leicht konischer, fast zylindrischer Form (Höhe desselben etwa  $10\text{ cm}^3$ ), füge  $0,7\text{ cm}^3$  der Bertrandschen Seignette-Salzlösung und  $0,3\text{--}0,5\text{ cm}^3$  der Bertrandschen Kupfersulfatlösung hinzu, erhitze zunächst mit großer, später mit kleiner Flamme bis zum Sieden und halte die Flüssigkeit, mit einem Uhrschildchen bedeckt,  $3\text{--}3\frac{1}{2}$  Min. lang in schwachem Sieden.

Jetzt gieße man die noch warme Flüssigkeit in ein etwa  $30\text{ cm}^3$  fassendes Zentrifugiergefäß und wasche den Rest zweimal mit je  $1\text{ cm}^3$  ausgekochtem destillierten Wasser nach. Das Kochkölbchen wird sofort mit  $1\text{ cm}^3$  der Bertrandschen Eisensulfatlösung versetzt und zunächst aufbewahrt. Das Zentrifugenröhrchen wird sofort  $2\text{--}5$  Min. lang zentrifugiert, bis der Niederschlag fest am Boden haftet. Man hebe nun mit einer Pipette, die etwa wie eine Augentropfpipette, aber mit capillarer Spitze eingerichtet ist, und deren Öffnung man stets dicht unter dem Flüssigkeitsniveau hält, die Flüssigkeit so weit ab, daß ihre Höhe nur noch etwa  $2\text{--}3\text{ cm}$  beträgt (oder man saugt an der Wasserstrahlpumpe ab) und zentrifugiere nun nochmals  $2\text{--}5$  Min. Dann klebt der Niederschlag gewöhnlich gut am Boden.

Nun gieße man vorsichtig die Flüssigkeit ab, soweit es ohne Verlust des Niederschlages möglich ist. Man wische den Rand des Glases mit einem Tuch aus und gieße die in dem Kochkolben aufbewahrte Eisensulfatlösung sofort in das Zentrifugenglas und wasche sie zweimal mit je  $1\text{ cm}^3$  ausgekochtem destilliertem Wasser nach. Durch leichtes Schwenken und Umrühren mit einem dünnen Glasstab wird der Niederschlag in Lösung gebracht und sofort titriert mit frisch aus  $0,1\text{-n}$ -Lösung hergestelltem  $0,01\text{-n}$ -Permanganat. Man benutze eine in  $0,01\text{ cm}^3$  geteilte Bürette von  $3\text{ cm}^3$  Fassungsraum. Die Größe der aus dem Glashahn abfallenden Tropfen soll etwa  $0,028\text{ cm}^3$  betragen. Man lasse die Permanganatlösung erst rasch, dann langsamer hinzu und bewege das Zentrifugierglas nicht lebhafter als zur Verteilung der Tropfen eben nötig ist. Nähert man sich dem Ende der Titration, so sind folgende Vorschriften zu beobachten. Man lasse 2 Tropfen Permanganat auf einmal hinzu, verteile sie durch ganz leichte Bewegung, halte nun das Zentrifugenglas gegen die weiße Unterlage ganz ruhig und beobachte die Entfärbung. Man läßt zunächst solange je 2 Tropfen hinzu, bis die auf diese Weise beobachtete Färbung  $5\text{--}7$  Sek. überdauert. Nunmehr schüttle man heftig, und zwar wiederum



5—7 Sek. lang. Tritt in dieser Zeit nachträglich völlige Entfärbung ein, so gebe man noch 2 Tropfen zu; ist die Entfärbung nicht vollkommen, so gebe man nur noch 1 Tropfen hinzu; im Zweifelsfalle gebe man eher 1 Tropfen zuviel als zu wenig zu. Jetzt lese man den Stand der Bürette ab.

Parallelbestimmungen sind auf diese Weise auf mindestens  $0,07 \text{ cm}^3$  reproduzierbar. Daraus ergibt sich für eine Einzelbestimmung eine Fehlergrenze von  $\pm 2\%$  vom Mittelwert, wenn 1 mg Zucker und 5—7%, wenn 0,4 bis 0,5 mg titriert wird.

Die den Permanganatwerten zugehörigen Traubenzuckerwerte zeigt folgende Tabelle:

Permanganat $\text{cm}^3$	Zucker mg	Permanganat $\text{cm}^3$	Zucker mg
0,5	0,39	1,8	0,84
0,6	0,42	1,9	0,88
0,7	0,45	2,0	0,93
0,8	0,48	2,1	0,97
0,9	0,51	2,2	1,01
1,0	0,55	2,3	1,04
1,1	0,58	2,4	1,08
1,2	0,62	2,5	1,12
1,3	0,65	2,6	1,15
1,4	0,69	2,7	1,19
1,5	0,72	2,8	1,23
1,6	0,76	2,9	1,27
1,7	0,80	3,0	1,31

Tabellen für die Bertrand-Methode.

Invertzucker

Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg
10	20,6	25	49,8	40	77,7	55	104,0
11	22,6	26	51,7	41	79,5	56	105,7
12	24,6	27	53,6	42	81,2	57	107,4
13	26,5	28	55,5	43	83,0	58	109,0
14	28,5	29	57,4	44	84,8	59	110,9
15	30,5	30	59,3	45	86,5	30	112,6
16	32,5	31	61,6	46	88,3	61	114,3
17	34,5	32	63,0	47	90,1	62	115,9
18	36,4	33	64,8	48	91,9	63	117,6
19	38,4	34	66,7	49	93,6	64	119,2
20	40,4	35	68,5	50	95,4	65	120,9
21	42,3	36	70,3	51	97,1	66	122,6
22	44,2	37	72,2	52	98,8	67	124,2
23	46,1	38	74,0	53	100,6	68	125,9
24	48,0	39	75,9	54	102,3	69	127,5

## Invertzucker (Fortsetzung).

Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg
70	129,2	78	142,1	86	154,8	94	167,3
71	130,8	79	143,7	87	156,4	95	168,8
72	132,4	80	145,3	88	157,9	96	170,3
73	134,0	81	146,9	89	159,5	97	171,9
74	135,6	82	148,5	90	161,1	98	173,4
75	137,2	83	150,0	91	162,6	99	175,0
76	138,9	84	151,6	92	164,2	100	176,5
77	140,5	85	153,2	93	165,7		

## Galaktose

Zucker in mg	Kupfer in mg	Zucker in mg	Kupfer in mg
10	19,3	60	108,3
20	37,9	70	125,0
30	56,2	80	141,3
40	73,9	90	157,6
50	91,2	100	173,6

## Sorbose

Zucker in mg	Kupfer in mg	Zucker in mg	Kupfer in mg
10	15,4	60	88,4
20	30,5	70	102,3
30	45,3	80	115,9
40	59,9	90	129,4
50	74,2	100	142,8

## Arabinose

Zucker in mg	Kupfer in mg	Zucker in mg	Kupfer in mg
10	21,2	60	119,3
20	41,9	70	137,5
30	62,0	80	155,3
40	81,5	90	172,7
50	100,6	110	189,8

## Xylose

Zucker in mg	Kupfer in mg	Zucker in mg	Kupfer in mg
10	20,1	60	113,2
20	39,6	70	130,6
30	58,7	80	147,6
40	77,3	90	164,2
50	95,4	100	180,5

## Maltose.

Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg
10	11,2	33	36,5	56	61,4	79	86,1
11	12,3	34	37,6	57	62,5	80	87,2
12	13,4	35	38,7	58	63,5	81	88,3
13	14,5	36	39,8	59	64,6	82	89,4
14	15,6	37	40,9	60	65,7	83	90,4
15	16,7	38	41,9	61	66,8	84	91,5
16	17,8	39	43,0	62	67,9	85	92,6
17	18,9	40	44,1	63	68,9	86	93,7
18	20,0	41	45,2	64	70,0	87	94,8
19	21,1	42	46,3	65	71,1	88	95,8
20	22,2	43	47,4	66	72,2	89	96,9
21	23,3	44	48,5	67	73,3	90	98,0
22	24,4	45	49,5	68	74,3	91	99,0
23	25,5	46	50,6	69	75,4	92	100,1
24	26,6	47	51,7	70	76,5	93	101,1
25	27,7	48	52,8	71	77,6	94	102,2
26	28,9	49	53,9	72	78,6	95	103,2
27	30,0	50	55,0	73	79,7	96	104,2
28	31,1	51	56,1	74	80,8	97	105,3
29	32,2	52	57,1	75	81,8	98	106,3
30	33,3	53	58,2	76	82,9	99	107,4
31	34,4	54	59,3	77	84,0	100	108,4
23	35,5	55	60,3	78	85,1		

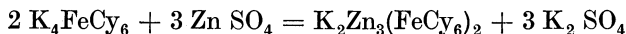
## Laktose.

Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg	Zucker mg	Kupfer mg
10	14,4	33	46,1	56	76,2	79	105,4
11	15,8	34	47,4	57	77,5	80	106,7
12	17,2	35	48,7	58	78,8	81	107,9
13	18,6	36	50,1	59	80,1	82	109,2
14	20,0	37	51,4	60	81,4	83	110,4
15	21,4	38	52,7	61	82,7	84	111,7
16	22,8	39	54,1	62	83,9	85	112,9
17	24,2	40	55,4	63	85,2	86	114,1
18	25,6	41	56,7	64	86,5	87	115,4
19	27,9	42	58,0	65	87,7	88	116,6
20	28,4	43	59,3	66	89,0	89	117,9
21	29,8	44	60,6	67	90,3	90	119,1
22	31,1	45	61,9	68	91,6	91	120,3
23	32,5	46	63,3	69	92,8	92	121,6
24	33,9	47	64,6	70	94,1	93	122,8
25	35,2	48	65,9	71	95,4	94	124,0
26	36,6	49	67,2	72	96,6	95	125,2
27	38,0	50	68,5	73	97,9	96	126,5
28	39,4	51	69,8	74	99,1	97	127,7
29	40,7	52	71,1	75	100,4	98	128,9
30	42,1	53	72,4	76	101,7	99	130,2
31	43,4	54	73,7	77	102,9	100	131,4
32	44,8	55	74,9	78			

Josephson<sup>1)</sup> weist darauf hin, daß bei Bertrand-Lösungen die einige Monate aufbewahrt worden sind, die Zuckerbestimmungen bisweilen zu hoch ausfallen.

Methode nach Hagedorn-Jensen<sup>2)</sup>.

Prinzip: Die Methode ist wie die Bertrandsche eine Reduktionsmethode. Die Traubenzuckerlösung reduziert eine alkalische Ferricyanidlösung. Das gebildete Ferrocyanid wird als Zinkverbindung ausgefällt:



und das überschüssige Ferricyanid jodometrisch bestimmt:  
 $2 \text{H}_3\text{FeCy}_6 + 2 \text{HJ} = 2 \text{H}_4\text{FeCy}_6 + 2 \text{J}$ .

Erforderliche Lösungen: 1. Wässrige Lösung von 1,65 g Kaliumferricyanid (zur Analyse) und 10,6 g wasserfreiem Natriumcarbonat auf 1000 cm<sup>3</sup>. Vor Licht geschützt aufbewahren.

2. Kaliumjodid- Zinksulfat- NaCl-Lösung. 5 g Kaliumjodid, 10 g Zinksulfat puriss. eisenfrei, 50 g Natriumchlorid ad 200 cm<sup>3</sup>. Von der Lösung eine größere Menge ohne Kaliumjodid vorrätig halten und nach Bedarf kleinere Mengen mit Kaliumjodid bereiten.

3. Essigsäure. 3 cm<sup>3</sup> eisenfreier Eisessig Kahlbaum auf 100 cm<sup>3</sup> Wasser.

4. Stärkelösung. 1 proz. in gesättigter Kochsalzlösung.

5. Thiosulfatlösung. 0,7 g Natriumthiosulfat in 500 cm<sup>3</sup> Wasser. Titerstellung mit Kaliumjodat. Von reinstem wasserfreiem Kaliumjodat-Salz werden 0,3566 g auf 2 l gelöst.

6. Für die Eiweißfällung:

- |                     |   |
|---------------------|---|
| a) n/10 Natronlauge | } alle 8 Tage frisch zubereiten aus 2 n |
| b) 0,45% Zinksulfat |   |

Ausführung:

Enteweißung: In ein Präparatenglas (15 × 150 mm) werden 1 cm<sup>3</sup> 1/10-n-NaOH und 5 cm<sup>3</sup> einer 0,45proz. Zinksulfatlösung gegeben, wonach ein gelatinöser Niederschlag aus Zinkhydroxyd entsteht. Nun wird 0,1 cm<sup>3</sup> Blut mittels Capillarpipette abgemessen, in die Zinkhydroxydaufschwemmung ausgeblasen und die Capillarpipette zweimal mit der Mischung ausgespült und ausgeblasen. Das Präparatenglas wird dann im siedenden Wasserbad 3 Min. erhitzt. Hierdurch fällt das Eiweiß in groben, grauen Ballen vollständig aus. Nun wird durch einen

<sup>1)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 1758. 1923.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 135. S. 46; Bd. 137, S. 92. 1922.

kleinen Trichter von 3—4 cm Durchmesser, der mit einem kleinen Filter aus ausgewaschener, mit Wasser naß gemachter Baumwolle beschickt ist, und in einem Präparatenglas (30 × 90 mm) steht, filtriert, Trichter und Filter werden mit Hilfe der Pipette zweimal mit je 3 cm<sup>3</sup> Wasser nachgewaschen.

Zuckerbestimmung: Zu dem Filtrat werden 2 cm<sup>3</sup> der alkalischen Ferricyanidlösung (Lösung 1) zugesetzt und das Präparatenglas wird 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. (Es genügt auch, die Gläser unter einer Glasglocke 30 Minuten lang dem Dampf eines siedenden Wasserbades auszusetzen.) Nach dem Abkühlen soll innerhalb von 6 Std. titriert werden. Es werden 3 cm<sup>3</sup> der Kaliumjodidlösung zugefügt, gemischt, dann wird mit 2 cm<sup>3</sup> der Essigsäure angesäuert und das ausgeschiedene Jod unter Zusatz von 2 Tropfen der Stärkelösung titriert. Um den beim Blindversuch ermittelten Verbrauch an Thiosulfat in Abzug zu bringen, wird nicht dieser Blindwert von dem beim eigentlichen Versuch erhaltenen Wert abgezogen, sondern dieser Wert auf Glucose umgerechnet (an Hand der Tabelle) und dann in Abzug gebracht. Z. B. in einem Versuch werden verbraucht in 0,1 cm<sup>3</sup> Blut 1,28 Na-Thiosulfat, im Blindversuch 1,82 cm<sup>3</sup> Na-Thiosulfat, also in Glucose umgerechnet 0,127 — 0,031 = 0,096 mg Glucose in 0,1 cm<sup>3</sup> Blut.

Tabelle zur Mikrozuckerbestimmung nach Hagedorn-Jensen.  
cm<sup>3</sup> n/200 Natriumthiosulfat-mg Glucose.

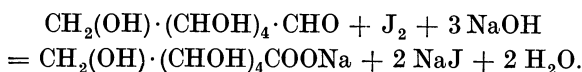
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Methode nach Willstätter und Schübel<sup>1)</sup>.

Das Verhalten der Aldosen gegen Hypojodit ermöglicht auf Grund einer streng stöchiometrisch verlaufenden Reaktion eine quantitative Bestimmung neben Fructose und Saccharose, die rasch ausführbar und selbst bei kleinen Substanzmengen genau ist.

Der Verlauf der Reaktion hängt nur von der geeigneten Alkalikonzentration und -menge ab. Die Hypojoditlösung darf nicht zu stark alkalisch sein, sonst reagiert sie zu träge, während die Hexose im alkalischen Medium den bekannten Verschiebungen unterliegt und die entstehende Gluconsäure andererseits während der Dauer des Versuchs weiter oxydiert wird. Die Oxydation der Aldose fällt in die Zeit der Hypojoditzersetzung, bei beträchtlicher Alkalikonzentration läßt sich aber der Zeitpunkt für das Ende der Reaktion nicht genau angeben. Die Alkalimenge soll auch nicht zu gering sein, sie muß mindestens zur Neutralisation der entstehenden Gluconsäure hinreichen.

Die Reaktion verläuft mit großer Geschwindigkeit und glatt mit n/10-Lösungen und bei Anwendung von Jod und Natronlauge im Verhältnis der Reagenzien zueinander, das der Gleichung entspricht:



Ausführung: Die Glucoselösung wird mit ungefähr dem  $1\frac{1}{2}$ —4fachen der erforderlichen Menge Jod in n/10-Lösung versetzt; man läßt bei Zimmertemperatur unter gutem Umschütteln das  $1\frac{1}{2}$ fache der erforderlichen Menge von n/10 NaOH zutropfen und 12—15 Min., bei sehr geringer Zuckermenge besser 20 Min., stehen. Dann säuert man mit verdünnter Schwefelsäure schwach an und titriert mit Thiosulfat bei Gegenwart von Stärke zurück.

Bei der Konzentration von 1<sup>o</sup>/<sub>0</sub> Glucose und Mengen von beispielsweise 100 mg war der größte Fehler 0,1 mg, der durchschnittliche Fehler beträgt demnach einige Zehntel Prozent der Substanz; bei 0,1 proz. Glucose und Mengen von 10 mg bleibt der Fehler in den einzelnen Bestimmungen unter  $1\frac{1}{2}$ <sup>o</sup>/<sub>0</sub>.

Unter den angegebenen Verhältnissen verbraucht Rohrzucker und Fruchtzucker gar kein Hypojodit. Die Hypojodit-Methode ist daher zur Bestimmung von Aldehydzucker neben Fructose und Saccharose geeignet.

<sup>1)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 51, I, S. 780, 1918. Vgl. auch Pouchard, M. E.: Journ. Pharm. et de Chimie. Bd. 118, [Serie 8, Bd. 3], S. 248. 1926.

Bei Anwendung einer größeren Zuckermenge und längerer Einwirkungsdauer bleibt die Oxydation der Glucose nicht bei der Gluconsäure stehen, sondern geht weiter. Durch Zusatz von Puffern kann man einen Teil der Fehler ausschalten<sup>1)</sup>. Die Zuckerrösung, die zweckmäßig nicht mehr als etwa 100 mg Glucose in etwa 25 cm<sup>3</sup> enthalten soll, wird mit 0,1-n-Jod-Jodkaliumlösung in solcher Menge versetzt, daß die Hälfte oder mindestens ein Drittel davon unverbraucht bleibt. Sodann werden 100 cm<sup>3</sup> eines Gemisches gleicher Raunteile 0,2 molarer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 0,2 molarer NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugefügt und die Mischung im Dunkeln 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> bis höchstens 2 Std. stehen gelassen. Danach wird mit 12 cm<sup>3</sup> 25 %iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert und das freie Jod mit 0,1-n-Thiosulfatlösung unter ständigem Umschütteln bei Stärkezusatz zurücktitriert. Der Verbrauch an Thiosulfat wird von demjenigen abgezogen, der am gleichen Tage in blinden Versuchen für die gleiche Menge Jodlösung unter Anwendung derselben Mengen Carbonatgemisch und Schwefelsäure verbraucht wurde. Von der Differenz entspricht 1 cm<sup>3</sup> 0,1-n-Jod-Lösung 9,005 mg Glucose (oder 18,01 mg kristallwasserhaltiger Lactose oder Maltose).

#### Polarimetrische Methode.

Sie zeichnet sich vor allen anderen durch ihre Genauigkeit und leichte Handhabung aus. Die Enddrehung einer Rohrzuckerlösung sowohl nach Säurehydrolyse als auch nach fermentativer Spaltung beträgt:  $L \max = R \max (0,44 - 0,005 t^\circ)$ , wobei  $L \max$  die maximale Linksdrehung einer vollständig invertierten Rohrzuckerlösung vom anfänglichen Drehungsvermögen  $R \max$  bei der Temperatur  $t$  bedeutet.

Bei der Beobachtungstemperatur von 20° wird die Drehung  $D = \pm 0^\circ$ , wenn 75,93%<sub>0</sub> des vorhandenen Rohrzuckers gespalten sind. Als Beobachtungstemperatur ist jede Temperatur von 0—40° geeignet.

Der optimale  $p_h$  wird gewöhnlich durch primäres Alkali-phosphat ( $p_h = \text{ca. } 4,5$ ) oder Acetatpuffer (z. B. Natriumacetat: Essigsäure = 1:1,  $p_h = 4,63$ ) eingestellt. Der Puffergehalt der Rohrzuckerlösungen soll etwa  $n/50 - n/100$  betragen.

Über die optischen Daten vgl. S. 21.

Bei der polarimetrischen Bestimmung ist auf die Multitrotation der Traubenzuckerlösung zu achten. Man kann durch Zufügen

<sup>1)</sup> Vgl. Auerbach, Fr. u. E. Bodländer: Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 36, S. 602. 1923.

von Soda die endgültige Einstellung beschleunigen. Zur Ausführung der Zeitwertbestimmung nach Willstätter und Racke<sup>1)</sup> vgl. S. 132.

Elektrometrische Zuckerbestimmung  
nach E. Mislowitzer<sup>2)</sup>.

Das bei der Reduktion aus dem Kupfersulfat gebildete Cuproxyd wird in der Bertrand'schen Methode über das Ferri- und Ferroeisen mit Permanganat titriert. Bei der ursprünglichen Methode und auch allen bisherigen Abänderungen wird das  $\text{Cu}_2\text{O}$  aus der Reduktionsflüssigkeit durch Abfiltrieren oder Abzentrifugieren entfernt. Diese Isolierung muß geschehen, weil sich Ferroeisen nicht in Gegenwart von einer organischen Substanz, in diesem Falle von weinsaurem Natrium, mit Permanganat titrieren läßt.

Wählt man zur Oxydation des Ferroeisens Bromat und nimmt man an Stelle des weinsauren das citronensaure Salz, so läßt sich die Titration ohne weiteres in der mit Ferrieisen versetzten und angesäuerten Reduktionsflüssigkeit ausführen. Eine Abtrennung des  $\text{Cu}_2\text{O}$  erübrigt sich nunmehr.

Das Ende der Titration wird bei der Anwendung von Permanganat an dem Auftreten des rosa Farbtones erkannt. Bei der Oxydation des Ferroeisens durch Bromat erscheint keine charakteristische Farbe. Es kann daher als Indicator nur der am Ende der Oxydation auftretende Potentialsprung dienen. Somit läuft die Zuckerbestimmung auf die elektrometrische Bestimmung von Ferroeisen hinaus.

Beim Eintauchen einer Platinelektrode in eine Ferri-Ferrosalzlösung entsteht an der Elektrode eine bestimmte Ladung. Sie wird durch folgende Formel ausgedrückt:

$$E = A + 0,058 \log \frac{c \text{Fe}^{\dots}}{c \text{Fe}^{\dots}} \text{ Volt.}$$

In dieser Formel ist  $A$  eine Konstante, das sogenannte Normalpotential des elektromotorisch wirksamen Vorganges. Das Normalpotential gilt für den speziellen Fall, daß in der Lösung die Konzentration  $c$  der verschiedenen Oxydationsstufen gleich eins ist, es ist von der Wahl der Bezugslektrode abhängig. Werden in einer Lösung Ferroionen zu Ferriionen oder Ferriionen zu Ferroionen, so ändert sich das Elektrodenpotential  $E$ . Diese Änderung ist nicht groß, wenn in der Lösung noch ein Gemisch von Ferri-

<sup>1)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1. 1920/21.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 168, S. 217. 1926.



und Ferroionen übrig bleibt, sie ist aber sehr erheblich, wenn eine Oxydationsstufe völlig verschwindet. Der Endpunkt der Reaktion  $\text{Fe}^{\cdot\cdot} + \text{F} = \text{Fe}^{\cdot\cdot\cdot}$  oder  $\text{Fe}^{\cdot\cdot\cdot} - \text{F} = \text{Fe}^{\cdot\cdot}$  läßt sich daher an dem Auftreten einer plötzlichen Potentialänderung, eines Potentialsprunges erkennen. Die Menge Ferroeisen, die in einer Lösung ist, wird mit Hilfe eines Oxydationsmittels, in diesem Falle mit Bromat, elektrometrisch titriert, wobei der Potentialprung der Indicator für die Beendigung der Reaktion ist.

Es werden nicht die einzelnen Potentialdifferenzen nach jedem Zusatz von Maßflüssigkeit gemessen und die Unterschiede miteinander verglichen, sondern es wird bei fester Brückenstellung so lange titriert, bis der Zeiger des Meßinstruments nicht mehr nach rechts, sondern deutlich nach links ausschlägt. So ausgeführt, ist die elektrometrische Titration kaum schwieriger als eine Titration unter Benutzung von Farbindicatoren.

Prinzip. 1. Oxydation der Glucose in einer Lösung von Kupfersulfat, Natriumhydrat und citronensaurem Natrium.

2. Direkte Oxydation (ohne Isolierung) des gebildeten  $\text{Cu}_2\text{O}$  durch Ferrieisen in salzsaurem Lösung.

3. Titration des entstandenen Ferroeisens mit Hilfe von Bromat unter Verwendung des Potentialsprungs als Indicator.

Die Ausführung der Methode erfolgt in drei Abschnitten, welche sind:

1. Die Reduktion.
2. Der Umsatz Cuproferri zu Cupriferro.
3. Die elektrometrische Titration.

Die Methode ist als Mikro- und Halbmikromethode ausgearbeitet.

Die Reduktion geschieht bei der Mikromethode in Jenaer Bechern von 50 ccm Inhalt, 6,7 cm Höhe und 3,5 cm äußerem Durchmesser am Boden (schlanke Form), bei der Halbmikromethode in Jenaer Bechergläsern von 50 ccm Inhalt (Normaltyp). Die Becher werden auf einem Asbestdrahtnetz über freier Flamme stark erhitzt, so daß die Flüssigkeit nach  $1\frac{1}{2}$  bis 2 Minuten ins Sieden kommt. Dann wird die Flamme klein gestellt, ein Uhrglas auf den Becher gelegt und die Flüssigkeit genau 3 Minuten in schwachem, aber deutlichem Sieden gehalten. 3 bis 4 Glas-capillaren sind zur Vermeidung des Siedeverzugs in den Becher hineinzu stellen. Nach Beendigung der Reduktion wird das Uhrglas entfernt und der Becher in ein etwas größeres mit Wasser gefülltes Gefäß gestellt. Die Abkühlung ist schnell erreicht, und es kann nunmehr die Umsetzung von Kupfer und Eisen erfolgen.

Zu diesem Zwecke wird der Reduktionsflüssigkeit eine Salzsäure-Eisenlösung hinzupipettiert. Durch die Neutralisation hat sich die Flüssigkeit wieder erwärmt, kühlt sich aber in 2—3 Minuten beim Stehen oder in  $\frac{1}{2}$  Minute beim Kühlen in Wasser wieder auf Zimmertemperatur ab. (Die Siedecapillaren werden erst nach beendeter Bromattitration aus dem Becher herausgenommen.)

In den Becher wird eine Platinelektrode und ein elektrolytischer Stromschlüssel oder ein Agarröhrchen gestellt. Das andere Ende des Agarröhrchens führt in eine mit KCl-Lösung gefüllte Wanne, in die eine gesättigte Kalomelektrode eintaucht. Als Platinelektrode eignet sich ein Platindraht, der am Ende etwas Platinblech trägt. Bequemer ist es, mit den in Glasröhren eingeschmolzenen Platinelektroden zu arbeiten, die zur Ausrüstung der Becherglaselektrode<sup>1)</sup> gehören. Die Kalomelektrode bildet den negativen, die Platinelektrode den positiven Pol. Bei Benutzung des Potentiometers nach E. Mislowitzer stellt man den rechten Skalendrehknopf auf 800, den linken auf 0, schaltet vorsichtig den Einschalter von *A* in Richtung *E*. Der Zeigerausschlag geht nach rechts. Nun gibt man aus einer Mikrobürette in kleinen Portionen Bromat in den Becher, schüttelt nach jedem Zufügen einmal um und überzeugt sich nach jeder Portion durch vorsichtiges Betätigen des Einschalters, daß der Zeiger noch nach rechts ausschlägt. Man kann auch den Einschalter auf einer Mittelstellung zwischen *A* und *E* belassen und solange in das Becherglas unter gelindem Umschütteln Bromatlösung eintropfen lassen, bis der Zeiger in die Nähe des Nullpunktes gekommen ist. Steht der Zeiger beim Einschalten nach *E* still, oder bewegt er sich zum ersten Male nach links, so schüttelt man das Becherglas gut um, wodurch er zumeist noch einmal nach rechts zurückkehrt. Die Titration ist beendet, wenn der Zeiger nach dreimaligem Schütteln von wenigen Sekunden Dauer im Verlauf von 1 Minute beim Einschalten stets noch deutlich nach links ausschlägt. Beim Umschütteln des Bechers läßt man die Platinelektrode in der Flüssigkeit; man hält das Becherglas in der rechten Hand und mit den Fingern derselben Hand stützt man die Elektrode.

Leerwert. Stellt man die Platinelektrode in die Ferrisalzlösung, so wird das Potential gegenüber der gesättigten Kalomelektrode gewöhnlich noch unter 800 Millivolt liegen, d. h., der Zeiger wird beim Einschalten noch nach rechts schlagen. Gibt man tropfen-

---

<sup>1)</sup> Siehe Biochem. Zeitschr. Bd. 159, S. 72. 1925.

weise Bromatlösung hinzu, so wird nach wenigen Tropfen (zumeist nach zwei bis vier) der Endpunkt der Leertitration erreicht sein, der Zeiger also auch nach 1 Minute noch bei der Einschaltung von 800 Millivolt nach links abweichen.

Die bis zu diesem Punkte verbrauchte Bromatmenge ist nach Herstellung von neuen Lösungen jedesmal festzustellen. Untersucht man Lösungen, die außer Zucker noch sehr viele Salze enthalten, oder will man den Zuckergehalt enteigweißter physiologischer Flüssigkeiten feststellen, so ist es unumgänglich nötig, sich durch eine kurze Titration von der Größe des Leerwertes zu überzeugen.

Zu diesem Zwecke gibt man zunächst die Eisensalzsäurelösung, dann die Reduktionsflüssigkeit und dann die Versuchslösung (in dieser Reihenfolge) in einen Becher und titriert den Leerwert aus. Man achte darauf, daß man genau diejenigen Lösungsmengen auch zur Leertitration verwendet, die bei der Hauptbestimmung zur Anwendung kommen; man nehme also ebensoviel Eisensalzsäurelösung, die gleiche Menge der Reduktionslösung und vor allem auch dieselbe Menge des Blutfiltrats, des Leberfiltrats oder der sonstigen Zuckerlösung, wie bei der wirklichen Bestimmung.

Die aus physiologischen Flüssigkeiten stammenden Leerwerte sind zumeist besonders hoch und daher zu berücksichtigen.

Von den nach der Reduktion erhaltenen Bromatwerten sind dann die Zahlen, die bei der direkten Titration ohne vorhergehende Reduktion erhalten werden, also die Leerwerte, abzuziehen.

Wünschenswert ist es auch, sich von Zeit zu Zeit davon zu überzeugen, daß durch das Kochen der Reduktionslösung keine Erhöhung des Leerwertes erfolgt.

Man kann auch bei der Leerbestimmung immer so vorgehen, daß man die Reduktionslösung mit destilliertem Wasser zur vorgeschriebenen Gesamtsumme verdünnt, 3 Minuten im Sieden hält, abkühlt, die Eisensalzsäurelösung zusetzt und nunmehr erst mit Bromat titriert.

Da aber die Titration ohne vorhergehendes Sieden der Reduktionsflüssigkeit, die direkte Titration, meistens mit der eben beschriebenen völlig übereinstimmt, ist die erstere als einfachere und schnellere vorzuziehen.

Störungen. Die auftretenden Störungen lassen sich als solche der Reduktion und Titration erkennen.

Die Störungen bei der Reduktion rühren von zu heftigem

oder zu geringem Sieden her. Durch Auswahl der Asbestdrahtnetze, Regulierung der Bunsenbrenner und Erhitzen der Drahtnetze schon einige Zeit vor dem Aufstellen der Becher läßt sich stets ein ungefähr gleichzeitiger Siedebeginn und ein gleichmäßiges, ruhiges Sieden ermöglichen.

Störungen bei der Titration stammen wohl immer nur von der Platinelektrode her. Hat man mehrere der oben erwähnten Glasstabelektroden gebrauchsfertig vorrätig, so wechselt man gegebenenfalls nur die Elektrode aus. Starke Ammoniakdämpfe machen die Elektrode träge. Dasselbe wird durch Schwefelwasserstoff verursacht, doch lassen sich diese Gase ja stets vermeiden.

Die nicht im Gebrauch befindlichen Elektroden hält man in einer starken Bichromatschwefelsäurelösung. Die schlechten Elektroden erhitzt man einige Zeit in diesem Gemisch.

Herstellung der Lösungen. 1. Reduktionslösung.

72 g Natrium citricum von Schering, chem. Fabrik a. Akt., Berlin, werden in ungefähr 140 ccm Aqua dest. unter Erhitzen gelöst, filtriert und abgekühlt. 5,4 g Natriumhydrat werden in etwa 25 ccm Aqua dest. gelöst, abgekühlt und zur Citratlösung hinzugegeben. 1,68 g Kupfersulfat „zur Analyse“ werden in 25 ccm gelöst und zu der alkalischen Citratlösung hinzugefügt. Das Ganze wird auf 200 ccm aufgefüllt.

2. Salzsäure-Eisenlösung.

Ferrisulfatlösung, 50 g Ferrisulfat, 200 g konzentrierte Schwefelsäure (1,84) werden auf 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt. Davon 25 ccm und 225 ccm konzentrierte Salzsäure (1,19) ergeben die Salzsäure-Eisenlösung.

3. n/50 K-Bromatlösung und n/100 K-Bromatlösung; 0,783 g  $KBrO_3$  in 1 Liter gelöst, ergibt eine n/10-Lösung; n/50 und n/100 durch Verdünnen der n/10. Titerstellung über Jodid und Thiosulfat.

#### Mikromethode.

Anwendungsgebiet: 0,24 bis 0,90 mg Glucose in 5 ccm Gesamtvolumen. Auf die Volumina ist sorgsam zu achten!

Zuckerlösung, eventuell aufzufüllen auf . . . . .	5,0 cm <sup>3</sup>
Reduktionslösung . . . . .	2,0 „
zusammen. . . . .	7,0 cm <sup>3</sup>

Eisen-Salzsäurelösung . . . . .	3,0 cm <sup>3</sup>
Molarität der Bromatlösung n/100.	

Titrationwert . . . . .	A „
Leerwert . . . . .	L „
Differenzwert . . . . .	$\frac{A - L}{5} = a \text{ cm}^3$

$a \text{ cm}^3 \text{ Bromat} = a \cdot 0,4 + 0,084 \text{ mg Glucose.}$

## Halbmikromethode.

Anwendungsgebiet: 0,60 bis 2,40 mg Glucose in 10 cm<sup>3</sup> Gesamtvolumen.  
Auch hier sind die angegebenen Volumina genau einzuhalten!

Zuckerlösung, eventuell aufzufüllen auf . . . . .	10,0 cm <sup>3</sup>
Reduktionslösung . . . . .	4,0 „
zusammen . . . . .	14,0 cm <sup>3</sup>

Eisensalzsäurelösung . . . . .	5,0 cm <sup>3</sup>
Molarität der Bromatlösung n/50.	

Titrationwert . . . . .	A „
Leerwert . . . . .	L „
Differenzwert . . . . .	a cm <sup>3</sup>

$$a \text{ cm}^3 \text{ Bromat} = a \cdot 0,74 + 0,2 \text{ mg Glucose.}$$

## Bestimmung der Maltase.

Zur Maltasebestimmung sind die oben angeführten Reduktions-Methoden auch brauchbar. Da Maltose ein geringeres Reduktionsvermögen besitzt als Glucose (vgl. S. 152), so wird mit fortschreitender Spaltung der Maltose das Reduktionsvermögen der Mischung zunehmen. Der Grad der Zunahme der reduzierenden Kraft dient als Maß der Maltasewirkung.

Willstätter, Oppenheimer und Steibelt bedienen sich der polarimetrischen Methode. Der optimale  $p_h$  (6,1—6,8) wird durch Zusatz von  $\frac{1}{10}$  molar. Phosphatmischung, bestehend aus gleichen Teilen 0,90 proz.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 1,20 proz.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , eingestellt<sup>1)</sup>. Die Maltose (Hydrat) wird als 10 proz. Lösung gebraucht und mit einem Gehalt von 20% des Puffers bei 30° im Meßkolben bereitet. 25 cm<sup>3</sup> dieser Mischung werden mit Enzymlösung und Wasser von derselben Temperatur auf das doppelte Volumen gebracht. Zur Polarisation werden 25 cm<sup>3</sup> der 30° warmen Versuchslösung in 5 cm<sup>3</sup> 2-n-Soda eingetragen.

Spez. Drehung vgl. S. 22. Die Drehung muß im Verlaufe der fermentativen Spaltung abnehmen.

Zur Untersuchung der Maltasewirkung des Blutserums und der Leber verschiedener Tiere verfuhr Ch. Kusumoto<sup>2)</sup> wie folgt: Proben von 5 ccm Blutserum oder 5 ccm des wässerigen Leberextraktes wurden mit 5 cm<sup>3</sup> einer 10 proz. Maltoselösung und 0,2 cm<sup>3</sup> Toluol bei 30° gehalten. Unmittelbar nach Herstellung des Gemisches und dann nach bestimmten Zeiten wurden die Proben enteiweißt und ihr Drehungsvermögen bestimmt. Angewandt wurde die Enteiweißungsmethode nach M. Abeles<sup>3)</sup>:

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 110, S. 232. 1920.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 14, S. 217. 1908.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 15, S. 495. 1891.

Die Proben wurden mit 25 cm<sup>3</sup> einer 5 proz., unter Erwärmen hergestellten Lösung von Zinkacetat in 96 proz. Alkohol versetzt, mit Alkohol im Meßkolben auf 50 ccm aufgefüllt, dann wurde umgeschüttelt, durch ein trockenes Filter filtriert und das Drehungsvermögen im 2 dm Rohr bestimmt. — Bei den Leberextrakten mußten, neben den mit Maltose versetzten Proben, Proben ohne Maltose aufgestellt werden, in denen das Drehungsvermögen in gleicher Weise bestimmt wurde, wie bei den mit Maltose versetzten Proben. Die bei ihnen gefundene Drehung wurde von den bei den Maltoseproben gefundenen abgezogen.

Bestimmung des Emulsin. Nach Willstätter und Csányi<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die bei der Spaltung gebildete Blausäure wird abgedampft und die entstandene Glucose nach Bertrand bestimmt.

Ausführung: Im Jenaer Rundkolben von 1/2 l Inhalt werden 10 cm<sup>3</sup> 1,0 proz. Amygdalinlösung mit etwas Toluol, mit 2—4 cm<sup>3</sup> Puffermischung (n/10 Acetatgemisch im Verhältnis 20 Natriumacetat : 1 Essigsäure) und so viel Wasser versetzt, daß mit der hinzuzufügenden Enzymlösung das Volumen auf 20,0 cm<sup>3</sup> kommt und im Thermostaten auf 30,0° vorgewärmt. Die Enzymlösung, 1—5 cm<sup>3</sup>, enthaltend 0,5—5 mg Emulsin oder die Suspension der Pflanzensubstanz, z. B. von 10 mg Pulver entölter Mandeln, wird unter Umschwenken eingegossen. Die Zeitmessung wird in der Mitte der Einflußdauer begonnen. Eine Vergleichsprobe zur Bestimmung der Eigenreduktion des Emulsins (die gering, oft ganz unerheblich ist), wird daneben in gleicher Weise, nur ohne Amygdalin angesetzt. Nach der Reaktionsdauer, gewöhnlich 30—60 Min., wird die Emulsinwirkung durch Zusatz von höchstens 2 cm<sup>3</sup> 10 proz. Schwefelsäure unterbrochen. Dann wird die Flüssigkeit zur Vertreibung der Blausäure 30 Min. der Dampfdestillation unterworfen, und zwar so, daß das Volumen tunlichst unverändert bleibt und dann die Bestimmung nach Bertrand vorgenommen.

Beispiel<sup>2)</sup>: Angewandt wurde ein mit Essigsäure angesauerter ammoniakalischer Extrakt aus entölte bitteren Mandeln (aus 20 g 500 cm<sup>3</sup>) und davon 0,2 cm<sup>3</sup> (1 cm<sup>3</sup> der 5fach verdünnten Lösung) zur Messung verwendet entsprechend 8 mg Mandelpulver. Einwirkung auf 0,1 g Amygdalin während 60 Min. Nach Bertrand wurden verbraucht 6,6 cm<sup>3</sup> 0,156-n-Permanganatlösung.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 172. 1921. — Willstätter u. Oppenheimer: Ebenda Bd. 121, S. 185. 1922.

<sup>2)</sup> Willstätter u. Csányi: l. c. S. 178.

Daraus ergaben sich 33,4 mg Glucose, d. i. 47,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Spaltung. Für diese Spaltung würde 1 mg nach der Proportionalität zwischen Geschwindigkeit und Enzymmenge 480 Min. erfordern. — Aus der Reaktionskurve der Amygdalinspaltung (vgl. a. a. O. Abb. 2) ergibt sich zum Spaltungsgrad von 47,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> der Abszissenpunkt 15,6, also zum Abszissenpunkt 17 der 50 proz. Spaltung die Zeit von 523 Min. Das ist der Zeitwert der aus 1 mg entölter Mandeln gewonnenen Emulsinlösung (vgl. S. 139). Zur Bestimmung der Emulsinausbeute ist der „Menge-Zeit-Quotient“ anzugeben, d. i. der Quotient des in irgendeiner Form vorliegenden emulsinhaltenen Materials (mg) und seiner Wirkungszeit. Z. B. lieferten 20 g Mandeln vom Zeitwert 480 (M : Z = 41,7) 0,55 g Emulsin vom Zeitwert 18 (M : Z = 30,6) Ausbeute 73,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

Die quantitativ weit geringeren Wirkungen des Fermentes auf andere Glucoside sind mit der 20—100fachen Menge (50—250 mg Emulsin oder 500 mg Pulver von Mandeln) und in 6—40 Std. auszuführen. Auch die Puffermenge wird vermehrt (gewöhnlich auf 5 cm<sup>3</sup> n-Acetatmischung).

Die aus Prunasin und Amygdalin abgespaltene Blausäure wird vorher durch Destillation mit Wasserdampf entfernt; in den Fällen, wo keine Dampfdestillation nötig ist, wurde die enzymatische Reaktion durch Zufügen der alkalischen Seignettesalzlösung unterbrochen.

Vorteilhaft ist nach R. Willstätter und G. Oppenheimer für den Vergleich der enzymatischen Wirkungen durchwegs mit äquimolekularen Mengen der Substrate die 50 proz. Spaltung anzugeben.

Äquimolekulare Lösungen der Substrate enthalten in 20 cm<sup>3</sup>:  
 0,2000 g Amygdalin (mit 3 H<sub>2</sub>O) Mol.-Gew. 511,3,  
 0,1155 g Prunasin Mol.-Gew. 295,1,  
 0,0794 g β-Methylglucosid mit 0,5 H<sub>2</sub>O, Mol.-Gew. 203,1,  
 0,1164 g Helicin (mit <sup>3</sup>/<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O), Mol.-Gew. 297,6<sup>1</sup>),  
 0,1119 g Salicin, Mol.-Gew. 286,1,  
 0,1002 g β-Phenylglucosid, Mol.-Gew. 256,1,  
 0,1064 g Arbutin, Mol.-Gew. 272,1<sup>1</sup>).

Bestimmung nach B. Helferich<sup>2</sup>).

Prinzip: Die Drehungsänderung einer Salicinlösung bei 0° wird bestimmt.

<sup>1</sup>) Die Kupferzahlen des Gemisches von Glucose + Hydrochinon neben Arbutin, wie auch diejenigen des Gemisches Glucose + Salicylaldehyd neben Helicin vgl. Willstätter und Oppenheimer: l. c., S. 187.

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 159. 1921. — Helferich, B., P. E. Speidel u. W. Toeldte: Ebenda Bd. 128, S. 99. 1923.

Ausführung: 2,5000 g Salicin werden im Meßkölbchen in etwa 60 cm<sup>3</sup> Wasser warm gelöst, auf Zimmertemperatur abgekühlt, 12,5 cm<sup>3</sup> n/10 Na-Acetat und 10,0 cm<sup>3</sup> n/10 Essigsäure zugegeben und nach dem Abkühlen bei 0° bis zu 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Die H-Ionenkonzentration dieser Lösung ist 1,7 · 10<sup>-5</sup>. Zur Bestimmung werden 10 mg Emulsin mit 1 cm<sup>3</sup> Wasser befeuchtet und nach 10 Min. mit 4 cm<sup>3</sup> obiger Salicinlösung versetzt. Die Anfangsdrehung (*A*) dieser Lösung ist im 2-dm-Rohr für Natriumlicht und 20° — 2,51°, die Enddrehung (*E*) unter denselben Bedingungen für vollständige Spaltung des Glucosids in Traubenzucker und Saligenin + 1,33°. Diese Glucosidlösung behält ihre Drehung bei Aufbewahren im Eisschrank unverändert für längere Zeit bei. Konzentrierte Lösungen von Emulsin sind manchmal ziemlich stark gefärbt, so daß man im 1- oder 0,5-dm-Rohr arbeiten muß.

Zur Unterbrechung des Versuchs wird jedesmal festes Kaliumcarbonat, das sich fast momentan auflöst, zugegeben, und zwar 0,2 g auf 5 cm<sup>3</sup> Glucosidlösung. Dadurch wird die Wirkung des Fermentes unterbrochen und die Rotation des entstandenen Zuckers stellt sich auf den Endwert ein.

Die Eigendrehung des Emulsins wird bei jedem Versuch für die gleiche Konzentration nach Zugabe der gleichen Menge Kaliumcarbonat besonders bestimmt und in Rechnung gesetzt. — Die Wirksamkeit veranschaulicht gut die Berechnung für die Zeit =  $\frac{\log 2}{k}$  (wobei *k* die nach dem monomolekularen Reaktionsverlauf berechnete Konstante ist); das ist die Zeit, die zur Spaltung von 50% des Glucosids bei den angewandten Konzentrationen von Glucosid und Ferment nötig ist, d. h.: Zeitwert eines Präparates (vgl. S. 133).

K. Josephson bedient sich in einer neueren Arbeit<sup>1)</sup> ebenfalls der polarimetrischen Methode. Zur Aufhebung der Mutarotation wurden bei den Versuchen mit  $\beta$ -Methylglucosid, Salicin und Helicin die Proben in 5 proz. Sodalösung einpipettiert; bei der Spaltung des Arbutins wurde die Fermentwirkung durch Sublimat (5 cm<sup>3</sup> gesättigte Sublimatlösung zu jeder Probe von 15 cm<sup>3</sup>) unterbrochen. Die Polarisation der Proben geschah erst, nachdem die Mutarotation der Glucose vollkommen beendet war (3 Stunden).

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 147, S. 1. 1925.



Spez. Drehung einiger Glucoside und die Enddrehung bei vollständiger hydrolytischer Spaltung derselben.

Glucosid	Spez. Drehung	Faktor zur Berechnung der Enddrehung aus der Anfangsdrehung
$\beta$ -Methylglucosid . . . . .	— 32,6	— 1,49
Salicin . . . . .	— 63,91	— 0,517
Helicin . . . . .	— 60,43	— 0,55
Arbutin . . . . .	— 64,3	— 0,541

Die mikroquantitative Bestimmung von Blausäure, pflanzlichen Blausäureverbindungen und Emulsin nach Brunswik<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die bei der Fermentwirkung in Freiheit gesetzte Blausäure wird bei 30—40° durch einen Kohlensäurestrom in schwach salpetersaures Silbernitrat abgeblasen. Das entstehende Silbercyanid wird auf ein Asbestfiltrerröhrchen gebracht und mit der Mikrowage gewogen.

Den benutzten Apparat zeigt Abb. 53.

Der Rezipient  $R_1$ , für ca. 5 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit bestimmt, kann durch zwei Hähne  $H_1$  und  $H_2$  abgeschlossen werden, um diesen Teil des Apparates bei der Untersuchung der Fermentwirkung für sich allein in einen Thermostat stellen zu können. Bei  $H_1$ , dem Hahnabschluß des eingeschmolzenen, bis 1 cm über den Boden des Rezipienten reichenden Einblaseröhrchens wird der Rezipient mit einem gewöhnlichen Kippschen Apparat zur CO<sub>2</sub>-Entwicklung — mit einer Waschflasche mit AgNO<sub>3</sub>-Lösung — verbunden. Nach Füllung mit dem Untersuchungsmaterial wird der Rezipient durch einen gut dichtenden Kautschukstopfen verschlossen und das Ableitungsrohr bei  $H_2$  mit einem paraffinierten Druckschlauch  $DS$  an das Gaseinleitungsrohr  $G$  angeschlossen. Dieses taucht in eine bauchige Eprovette  $E$  ein, deren unterster Teil (5 cm) auf 7 bis 8 mm verengt ist. Das Gaseinleitungsrohr besitzt zum Reinigen und Durchspülen eine obere Öffnung, die während der Bestimmung an der verengten Stelle mit einem Tröpfchen 5 proz. Salpetersäure abgedichtet und darüber mit einem kleinen Korkstopfen verschlossen ist. Der etwas größere Rezipient  $R_2$  ist für 10 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit bestimmt. Als Vorlage in der Eprovette dient 1 proz., mit halogenfreier Salpetersäure leicht angesäuertes Silbernitrat. — Der entstandene Silbercyanidniederschlag wird wie bei den Pregl-

<sup>1)</sup> Oesterr. botan. Zeitschr. Bd. 74, S. 58.

schen Vorschriften zur Wägung der Silberhalogenide behandelt. Das Absaugen erfolgt wie S. 118 bei der Phosphatbestimmung beschrieben. Gründliches Nachwaschen abwechselnd mit Wasser und 96 proz. Alkohol, Trocknen 5 Min. im „Regenerationsblock“, 30 Min. langes Verweilen der Filterröhrchen vor der Wägung in der Wage. — Der Rezipient ( $R_1$  oder  $R_2$ ) taucht während der Bestimmung in Wasser von  $30-37^\circ$ , die Eprouvette in ein größeres Gefäß mit kaltem Wasser. — Der Zusatz von Flüssigkeiten (z. B. verdünnter Säure zum Freimachen der HCN aus dem Material bzw.

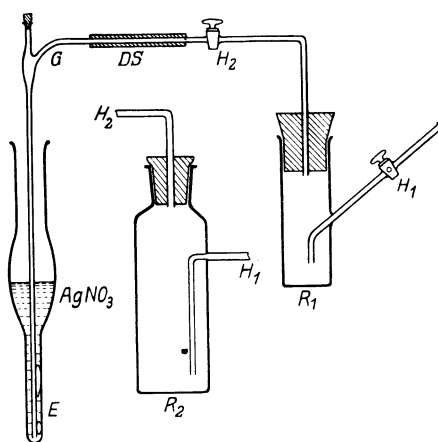


Abb. 53. Apparat zur mikroquantitativen Blausäurebestimmung ( $\frac{1}{3}$  der natürl. Größe).  $R_1$ , bzw.  $R_2$  Rezipienten.  $H_1$  und  $H_2$  Glashähne des Zu- und Ableitungsrohres,  $DS$  Druckschlauchverbindung.  $G$  Gaseinleitungsrohr,  $E$  bauchige Eprouvette, mit 1 proz. Silbernitrat gefüllt.

zur Beendigung der Fermentreaktion) erfolgt durch den über  $H_1$  befindlichen, erweiterten Glasansatz unter  $\text{CO}_2$ -Druck. Zum quantitativen Übertreiben der Blausäure muß bei dem kleinen Rezipienten  $2\frac{1}{2}-3$  Std., bei dem größeren 4 Std. abgeblasen werden. — Bei fermentativen, Blausäure liefernden Systemen kann durch ein intermittierendes Abblasen während der Fermentwirkung die Spaltungsausbeute beträchtlich erhöht werden. Als  $p_h$ -Optimum für Emulsin wurde von Brunswik 4,74—6,56 gefunden.

#### Bestimmung der Lactase.

Auch hier werden die üblichen Bestimmungsmethoden (Polarisation, Reduktion) angewandt.

Willstätter und Oppenheimer<sup>1)</sup> bestimmten die gebildete Glucose nach Bertrand, indem sie 25 cm<sup>3</sup> der 10proz. Lösung von Lactose (wasserhaltiger Milchzucker von  $[\alpha]_D = +52,53^0$ ) mit 10 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer nach Sörensen im Verhältnis 3,8 prim.: 6,2 sek. Salz ( $p_h 7$ ;  $\frac{1}{3}$  molar. Phosphat, d. i. 360 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 175 \text{ mg KH}_2\text{PO}_4$ ) versetzten, mit der entsprechenden Enzymmenge (Hefelactase) und mit Wasser auf 50 cm<sup>3</sup> brachten und die Reaktion bei 30<sup>0</sup> ablaufen ließen. Proben von 5 cm<sup>3</sup> wurden entnommen und zum Abbrechen der Enzymreaktion in Meßkolben, die vorher mit 5 cm<sup>3</sup> 2-n-Sodalösung beschickt waren, eingetragen. Ein Fünftel des Gemisches wurde zur Zuckerbestimmung verwendet. Der Sodazusatz ist ohne Einfluß auf die Permanganatmengen.

Kupferzahlen der Gemische von Lactose und Glucose + Galaktose<sup>2)</sup>

Lactose cm <sup>3</sup>	Glucose + Galaktose ccm	Perm. 0,160 n ccm		Kupfer mg		Kupfer- Mittelwert mg
1	0	6,10	6,15	62,1	62,6	62,35
0,9	0,1	6,30	6,35	64,1	64,6	64,35
0,8	0,2	6,60	6,65	67,2	67,7	67,45
0,7	0,3	6,90	6,90	70,2	70,2	70,2
0,6	0,4	7,15	7,15	72,8	72,8	72,8
0,5	0,5	7,45	7,50	75,8	76,3	76,15
0,4	0,6	7,65	7,70	77,9	78,4	78,15
0,3	0,7	8,09	8,09	82,3	82,3	82,3
0,2	0,8	8,38	8,38	85,3	85,3	85,3
0	1,0	9,00	9,00	91,6	91,6	91,6

#### Bestimmung der Amylase.

Grundsätzlich sind zwei Methoden zu unterscheiden. 1. Solche, die die physiko-chemischen Änderungen des Substrates messen (Stärkeverflüssigung, Nephelometrie) und 2. solche, die die entstandenen Abbauprodukte bestimmen (Reduktionsmethoden, Polarisation).

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 118, S. 170. 1921.

<sup>2)</sup> Die Kupferzahlen wurden gewonnen, indem man 5proz. Lösungen der Lactose (wasserhaltig) und der äquimolekularen Gemische von Glucose und Galaktose in verschiedenen Verhältnissen aus Büretten in 25 ccm Kolben einfließen ließ, woraus nach Erwärmen auf 30<sup>0</sup> 5 ccm entnommen und auf 100 ccm aufgefüllt wurden. Zur Bestimmung dienten 20 ccm.

Bestimmung der Amylase nach M. Olsson<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die Viscositätsänderung einer Stärkelösung wird mittels der Zeit gemessen, die eine luftgefüllte Glaskugel in der Stärkelösung braucht, um eine bestimmte Strecke aufzusteigen. Die Verflüssigung verläuft viel schneller als die Verzuckerung.

Apparate (Abb. 54): 3 gleiche Rohre  $D$  von 3,5 dm Länge und 1,7 cm innerem Durchmesser, mit einem durchbohrten Gummistopfen verschlossen. Durch die Bohrung führt ein mit Gummischlauch und Klemme versehenes Glasrohr. Die 3 Glasröhren  $D$  sind auf einer drehbaren Achse montiert und befinden sich im Thermostaten. Im Innern der Rohre befindet sich eine Glaskugel von 6 mm Durchmesser.

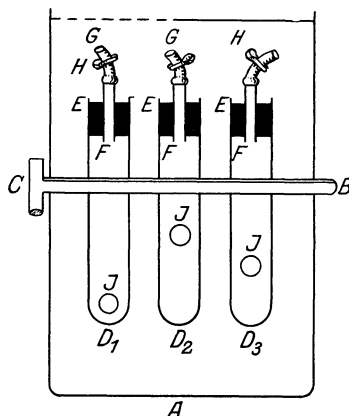


Abb. 54.

Ausführung: 22,5 g Kartoffelstärke werden in einer kleinen Menge kalten Wassers aufgeschlämmt, in 1 l kochendes Wasser eingegossen, 1 Std. am Rückflußkühler gekocht, durch ein Tuch filtriert und in ein Wasserbad von 37° hineingestellt. Je 50 cm<sup>3</sup> dieser Lösung werden in die Glasröhre  $D$ , in denen sich je eine Glaskugel befindet, eingefüllt; dazu 10 cm<sup>3</sup> Acetatpuffer ( $p_h = 5,15$ ) und die gewünschte Menge Enzymlösung (Malzamyase) — bei tierischer Amylase die entsprechende  $p_h$  und NaCl-Zusatz. Alle Lösungen müssen vorher auf 37° vorgewärmt sein. Der Gummistöpsel wird schnellstens eingepreßt. Hierbei wird alle Luft durch das Glasrohr entfernt und danach der am Glasrohr befestigte Gummischlauch mit einer Klemme  $H$  zugemacht. Unmittelbar darauf wird die Achse  $B$ , welche die Röhren  $D$  trägt, umgedreht. Die Röhren werden durch Fenster des Thermostaten  $A$  betrachtet und die Aufsteigezeit der verschiedenen Glaskugeln mittels Chronographen festgestellt.

Im Rohre  $D_1$  (ohne Enzym) durchläuft die Kugel die Lösung in fast konstant 48 Sek. Im Rohre  $D_2$  (mit Enzym) wird die Aufsteigezeit kontinuierlich kleiner, und die Lösung hat schon in 1 Std. die Viscosität des Wassers beinahe erreicht, die einer Aufsteigezeit von 10 Sek. entspricht.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 119, S. 1. 1922, vgl. auch Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 91. 1921; Bd. 126, S. 29. 1923.

Jodmethoden<sup>1)</sup>.

Auch die Methoden, die sich der Veränderung der Jodreaktion bedienen, beruhen wohl auf einer physiko-chemischen Änderung des Substrates (Karrer).

Ausführung nach Wohlgemuth. Eine Reihe Reagensgläser wird mit absteigenden Mengen der zu untersuchenden Fermentlösung beschickt, zu jeder Fermentportion die gleiche Menge einer 1proz. Stärkelösung zugefügt, dann die Gläschen auf einmal auf 38—40° gebracht, nach einer bestimmten Zeit wieder abgekühlt und nun durch Zusatz von mehreren Tropfen  $\frac{1}{10}$ -n-Jodlösung festgestellt, welche kleinste Fermentmenge noch imstande ist, die angewandte Stärkemenge bis zum Dextrin abzubauen. Als unterste Grenze der Wirksamkeit (limes) ist dasjenige Gläschen zu bezeichnen, in dem zum ersten Male die blaurote Farbe auftritt. Die Enzymmenge wird daraus so berechnet, daß die Anzahl cm<sup>3</sup> einer 1proz. Stärkelösung bestimmt wird, die durch 1 cm<sup>3</sup> Fermentlösung unter den Bedingungen des Versuches bis zum Dextrin total abgebaut wird.

Ausführung nach Michaelis<sup>2)</sup>: Man kocht 2,5 g lösliche Stärke in 500 cm<sup>3</sup> 0,3proz. NaCl-Lösung auf und füllt in 7 Erlenmeyerkolben je 50 cm<sup>3</sup> davon ein. Außerdem gibt man eine Mischung von  $\frac{m}{3}$  prim. Phosphat (10 cm<sup>3</sup> 1 molar Phosphorsäure + 10 cm<sup>3</sup> n-NaOH + 10 cm<sup>3</sup> dest. Wasser) und von  $\frac{m}{3}$  sek. Phosphat (10 cm<sup>3</sup> 1 molar Phosphors. + 20 cm<sup>3</sup> n-NaOH) hinzu, und zwar

Kolben Nr.	1	2	3	4	5	6	7
$\frac{m}{3}$ prim. Phosphat . .	4,7	4,4	3,3	2,5	1,7	0,6	0,3
$\frac{m}{3}$ sek. Phosphat . .	0,3	0,6	1,7	2,5	3,3	4,4	4,7

Nun füllt man etwa 30 Reagensgläser mit je 5 cm<sup>3</sup> einer äußerst stark verdünnten, ganz schwach hellgelben Lugolschen Lösung (etwa 1/1000 n-Jodlösung) und hält diese für die weitere

<sup>1)</sup> Vgl. Wohlgemuth, J.: Fermentmethoden S. 39.

<sup>2)</sup> Michaelis: Prakt. d. phys. Chemie. S. 132. Berlin 1922. Diese Vorschrift von Michaelis dient zunächst dazu, das  $p_H$ -Optimum der Fermentwirkung festzustellen.

Untersuchung in Bereitschaft. In die 7 Erlenmeyerkolben gibt man in Abständen von genau 2 Min. der Reihe nach je 5 cm<sup>3</sup> eines 100—1000fach verdünnten Speichels. Dann entnimmt man aus dem Kölbchen Nr. 4 ( $p_h$  etwa 6,8) alle paar Minuten 5 cm<sup>3</sup> und gibt sie in ein Jodröhrchen. Zunächst wird eine blaue Farbe entstehen, weiterhin eine violette, dann eine rote. Wenn die Farbe rotviolett bis fast rot geworden ist, beginnt die eigentliche Reihenentnahme. Man entnimmt den 7 Kölbchen der Reihe nach in Abständen von 2 Min. je 5 cm<sup>3</sup> und gibt sie in ein Jodröhrchen. Das Resultat wird z. B. sein:

1	2	3	4	5	6	7
blau	violett	rot	gelbrot	rot	rotviolett	violett

Die Wirkung ist also am weitesten fortgeschritten in Nr. 4 ( $p_h = 6,8$ ).

L. Michaelis und H. Pechstein<sup>1)</sup> arbeiteten so, daß sie den fermentativen Prozeß durch Zusatz von 10 cm<sup>3</sup> 1/1000-n-Jodlösung unterbrachen. Eine so stark verdünnte Lösung wurde angewandt, um die Versuchsfehler, die beim Pipettieren der Jodlösung entstehen können, möglichst auszuschalten. Ein geringer Überschuß von Jod ruft nämlich in einer von zwei gleich weit abgebauten Stärkelösungen bereits eine andere Farbnuance hervor. Zu beachten ist die Beobachtung, daß im alkalischen Gebiete eine mehr oder minder schnelle Entfärbung der anfänglichen Jodfärbung eintritt. Die Unterbrechung des Fermentprozesses erfolgte in diesem Gebiete durch mit Essigsäure angesäuerte Jodlösung.

Bei der Bestimmung tierischer Amylasen ist darauf zu achten, daß sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Maltase nicht nur Maltose, sondern auch Glucose bildet.

Glucose neben Maltose läßt sich qualitativ durch Kupferacetatlösung (Barfoedsches Reagens) erkennen, die neutral von Maltose überhaupt nicht, mit Essigsäure angesäuert erst bei 4 Min. Kochdauer reduziert wird. — Beim Kochen mit Phenylhydrazin gibt die Glucose gleich, die Maltose erst beim Abkühlen einen Niederschlag des Osazons.

Nephelometrische Methode nach Rona und van Eweyk<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 75. 1914.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 149, S. 174. 1924.

Prinzip: Als Substrat dient Glykogen, das sehr stabile kolloidale Lösungen bildet, deren Trübungsgrad streng proportional ihrem Gehalt an Glykogen ist. Die Aufhellung infolge der Amylasewirkung wird nephelometrisch gemessen.

Erforderliche Lösungen: 1. Glykogenlösung. Einem Kaninchen werden etwa 50 cm<sup>3</sup> einer 50proz. Traubenzuckerlösung mittels der Schlundsonde eingegossen. Nach 2—3 Std. wird das Tier möglichst rasch durch Entbluten getötet, seine Leber herausgeschnitten und diese nach Entfernen der Gallenblase kurz mit kaltem Leitungswasser abgespült. Dann wird die Leber in etwa walnußgroße Stücke zerschnitten und (in Stanniol gewickelt) in eine Eis-Kochsalzkältemischung gebracht, bis die Stücke festgefroren sind. Sie werden im Mörser unter Zusatz von Kieselgur fein zerrieben. Der Leber-Kieselgurbrei wird mit 3% Trichloressigsäure innig verrührt und nach Zusatz von reichlich destilliertem Wasser abgenutscht. Das Filtrat, eine weiße trübe Flüssigkeit, enthält die Hauptmenge des Glykogens. Der Rückstand wird noch einmal mit Wasser verrieben und zum 2. Male filtriert. Das 2. Filtrat, das noch beträchtlich trübe ist, wird mit dem ersten vereinigt. Die beiden Filtrate werden nun mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt und bleiben über Nacht stehen; während dieser Zeit setzt sich das Glykogen als feinflockiger Niederschlag, der nirgends am Glase anklebt, zu Boden. Nach dem Dekantieren wird der Niederschlag durch Zusatz von destilliertem Wasser wieder gelöst, die Lösung in Zentrifugengläser gebracht, in diesen durch hinreichenden Alkoholzusatz das Glykogen ausgeflockt und durch Zentrifugieren ausgeschleudert. Nach dem Abgießen der überstehenden Flüssigkeit wird das Glykogen wieder in Wasser gelöst, mit Alkohol ausgefällt und nochmals zentrifugiert. Nach 5maliger Wiederholung der Operation wird schließlich der Rückstand mit absolutem Alkohol verrührt, scharf zentrifugiert, nach dem Abgießen des Alkohols mit Äther verrührt und abgenutscht. Es resultiert ein schneeweißes, sehr feines Pulver, das in Wasser sehr leicht stabile Suspensionen bildet, deren Viscosität gegenüber Wasser nicht meßbar erhöht und deren Trübung (Tyndalllicht) ihrer Konzentration streng proportional ist. Die Konzentration der 0,3proz. Ausgangslösungen wird mit 100 bezeichnet, so daß 50 einer Konzentration von 0,15% entspricht<sup>1)</sup>.

2. n/10 NaCl-Lösung (für tierische Amylasen).
3. Phosphatpuffer.
4. Enzymlösung (z. B. menschl. Speichel).

<sup>1)</sup> Käufliches Glykogen ist nicht immer verwendbar.

Ausführung: In eine Reihe von Meßzylindern von 100 cm werden je 91 cm<sup>3</sup> einer Glykogenlösung von 0,3% gebracht und mit 1—3 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer, sowie 1 cm<sup>3</sup> n/10-NaCl-Lösung vermischt. Nach dem eventuell erforderlichen Auffüllen auf 95 cm<sup>3</sup> werden die Zylinder in ein Ostwaldsches Wasserbad mit Rührwerk gestellt, dessen Temperatur 37° ± 0,05° beträgt und nach erfolgtem Temperatenausgleich je 5 cm<sup>3</sup> verdünnten menschlichen Speichels unter guter Durchmischung rasch zugegeben. Nach einer halben Minute werden aus jedem Zylinder 15 cm<sup>3</sup> des Reaktionsgemisches entnommen und in ein trockenes Fläschchen, das sich in Eiswasser befindet, eingefüllt. Derartige Probeentnahmen werden in geeigneten Intervallen wiederholt. Die eiskalten Proben werden möglichst bald nephelometrisch untersucht.

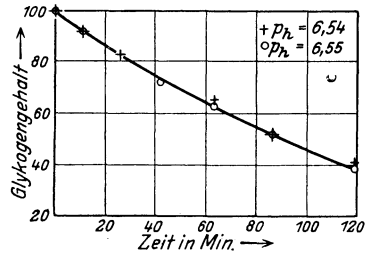


Abb. 55.

Tabelle 2 (Abb. 55).

	Zeit in Min.	Nephelometer		Um- rech- nung auf Proz.	$x$	$\frac{x}{t} \cdot 10^3$	$K \cdot 10^5$
		lks.	rechts				
0,4proz. Glykogenlösg. 91 cm <sup>3</sup>	1/2	20	23,4	100,0			
Ferment 1:100 . . . . . 5 „	11	20	25,4	92,0	8,0	725	327
Puffer (n/3) . . . . . 3 „	26	20	28,4	83,0	17,0	655	308
NaCl (n/10) . . . . . 1 „	63	20	36,1	65,0	35,0	555	296
	86	15	33,4	52,5	47,5	552	326
$p_H = 6,54$	119	12	34,5	40,8	59,2	498	326
Identische Versuchsanordnung	1/2	20	22,9	100,0			
	11	20	25,0	91,8	8,2	743	336
$p_H = 6,55$	42	20	31,7	72,0	28,0	670	338
	63	20	38,0	60,3	39,7	633	347
	86	15	32,8	52,3	47,7	555	327
	119	12	34,5	39,9	60,1	505	336

Als Beispiel folge eine Tabelle (Tab. 2), in der die erste Spalte die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und den elektrometrisch bestimmten  $p_h$  enthält; die 2. Spalte gibt an, zu welchem Zeitpunkt die Untersuchungsproben entnommen waren, die 3. und 4. Spalte die Stellung des Nephelometers, bei welchem auf der linken Seite die Vergleichs- und auf der rechten



Seite die Untersuchungslösung eingefüllt wurde, die 5. Spalte die Umrechnung der Nephelometerwerte, derart, daß die Ausgangskonzentration des Glykogens gleich 100 gesetzt wurde. Die 6. die prozentischen Abnahmen des Glykogengehaltes  $x$ , die 7. die Reaktionsgeschwindigkeit  $\frac{x}{t} \cdot 10^3$  und die 8. die Reaktionskonstante  $K$  der monomolekularen Reaktion.

Bestimmung der Pankreasamylase nach Willstätter,  
Waldschmidt-Leitz und Hesse<sup>1)</sup>.

Die Hydrolyse von 0,25 g löslicher Stärke durch Pankreasamylase in 37 cm<sup>3</sup> bei 37° wird im Bereich der ersten 40% verfolgt. Die gebildeten Aldehydgruppen werden mit der Hypojodit-Titration gemessen. Die Amylaseeinheit (Am.-E.) berechnet sich aus der Gleichung

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x},$$

in der  $t$  die Zeit,  $a$  die Anfangskonzentration und  $a-x$  die dem Jodverbrauch entsprechende Menge Maltose ist. Für  $a$  wird nicht der Wert der effektiven Einwage (0,25 g), sondern die praktische Verzuckerungsgrenze von 75% unter normalen Bedingungen, also  $a = 0,1875$  g genommen. Für die Bestimmung der Amylase werden am besten die Enzymmengen so gewählt, daß die Reaktionskonstante zwischen 0,001 und 0,03 liegt; dann erfolgt in 7—30 Minuten die Hydrolyse von 10—30% der Stärke.

Ausführung: In einer zylindrischen Standflasche mit eingeschlifffem Stopfen von 50 cm<sup>3</sup> Inhalt werden 25 cm<sup>3</sup> frisch bereitete 1 proz. Lösung von Kahlbaumscher löslicher Stärke, 10 cm<sup>3</sup> 0,2-n-Phosphatpuffer, bestehend aus 5,1 cm<sup>3</sup> 0,2-n-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 4,9 cm<sup>3</sup> 0,2-n-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2 H<sub>2</sub>O ( $p_h = 6,8$ ), sowie 1 cm<sup>3</sup> 0,2-n-NaCl vermischt und im Thermostaten auf 37° gebracht. Das Enzym fügt man unter Umschütteln hinzu, in Form des trockenen Präparats aus dem Wäageglas oder einer Enzymlösung, z. B. 1,00 cm<sup>3</sup> aus der Meßpipette. Nach Ablauf von gewöhnlich 10 Min. wird die Reaktion durch Zusatz von 2 cm<sup>3</sup> n-Salzsäure unterbrochen. Man spült das Reaktionsgemisch mit wenig Wasser in einen Erlenmeyerkolben und versetzt es mit Jod, und zwar für je 1 mg erwarteter Maltose mit 0,6 cm<sup>3</sup> 0,1-n-Lösung, sodann tropfenweise unter Umschütteln mit 0,1-n-Natronlauge, deren Menge so zu bemessen ist, daß nach Neutralisation der

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 126, S. 143 (155). 1923.

zugefügten Salzsäure und Umwandlung des sauren Puffer-Phosphats in sekundäres, (wozu zusammen 30 cm<sup>3</sup> erforderlich sind) noch das 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> fache vom Volumen der Jodlösung angewandt wird. Nach 15 Min. langem Stehen wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und das überschüssige Jod mit 0,1-n-Thiosulfatlösung zurücktitriert.

Den Eigenverbrauch der Stärke sowie der Enzymlösung an Jod ermittelt man zu gleicher Zeit durch eine Kontrollbestimmung. Zum Beispiel: 25 cm<sup>3</sup> 1proz. Stärkelösung wurden mit 2 cm<sup>3</sup> nHCl mit 10 cm<sup>3</sup> 0,2-n-Phosphatpuffer ( $p_h$  6,8) und 0,8 cm<sup>3</sup> einer Lösung von 1,0 cm<sup>3</sup> Glycerinauszug in 250 cm<sup>3</sup> Wasser vermischt. Darauf fügte man 10,01 ccm 0,1-n-Jodlösung und 45 cm<sup>3</sup> 0,1 n-NaOH hinzu und säuerte nach 15 Minuten mit 4 cm<sup>3</sup> 20proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> an. Zum Zurücktitrieren mit 0,1-n-Thiosulfatlösung wurden verbraucht 9,41 cm<sup>3</sup>. Der Jodverbrauch betrug also 0,60 cm<sup>3</sup>. Nach Abzug dieses Leerverbrauchs wird die gefundene Jodmenge nach dem Verhältnis 17,15 mg C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>:1 cm<sup>3</sup> <sup>1</sup>/<sub>10</sub>-n-Jod als Maltose berechnet.

2. Beispiel<sup>1)</sup>: 0,80 cm<sup>3</sup> einer Lösung, die aus 1,00 cm<sup>3</sup> Pankreasglycerinauszug mit 250 cm<sup>3</sup> Wasser bereitet war, wirkten unter den angegebenen Bedingungen 10 Min. auf die Stärke. Nach dem Unterbrechen der Hydrolyse durch Zufügen von Säure wurde bei der Titration des entstandenen Aldehydzuckers ein Verbrauch von 2,29 (wiederholt: 2,23) cm<sup>3</sup> n/10-Jod gefunden. Die Kontrollbestimmung ergab für die angewandte Stärke und Enzymlösung einen Leerverbrauch von 0,53 cm<sup>3</sup> (wiederholt: 0,53 cm<sup>3</sup>) n/10-Jod.

Aus dem verbrauchten Jod berechnet sich die gebildete Maltose 30,2 (29,2) mg und die Reaktionskonstante

$$k = \frac{1}{10} \log_{10} \frac{0,1875}{0,1875 - 0,0302} = 0,0076$$

(wiederholt 0,0074). Diese Reaktionskonstante drückt zugleich die Zahl der Amylaseeinheiten in der Analysenprobe aus.

Die Amylaseeinheit (Am.-E.) ist das 100fache derjenigen Enzymmenge, für die unter den angegebenen Versuchsbedingungen die Konstante der monomolekularen Reaktion gleich 0,01 ist. Die Reaktionskonstante drückt daher die Zahl der Amylaseeinheiten in der Analysenprobe aus. Wenn in einem weiteren Beispiel 0,5 mg Trockenpankreas aus Stärke in 10 Min. 78,6 mg Maltose

<sup>1)</sup> l. c. S. 156.

bildeten, so ist  $k = 0,0236$  zu berechnen, und dies ist gleichzeitig die Anzahl der Am.-E. in den angewandten 0,5 mg.

Eine Am.-E. ist in ungefähr 2 cg getrockneter Pankreasdrüse enthalten. Als Maß für den enzymatischen Reinheitsgrad eines Amylasepräparats schlägt Willstätter den Amylasewert (Am.-W) vor, nämlich die Zahl von Amylase-Einheiten in 1 cg der Substanz.

Bei Anwendung pflanzlicher Diastase erübrigt sich der Kochsalzzusatz;  $p_h$  ist durch Phosphat oder Acetat auf 5,0 einzustellen.

#### Bestimmung der Malzamyrase nach Euler und Svanberg<sup>1)</sup>.

Wie die Wirkungsfähigkeit von Saccharasepräparaten läßt sich auch die der Maltasepräparate durch eine Größe bestimmen, die den Trockensubstanzgehalt der Enzymlösung (bzw. des Präparates), die verzuckerungsfähige Substratmenge und die Reaktionsgeschwindigkeit  $k$  bei definierter Temperatur und Acidität der Lösung enthält. Es wird mit folgenden Volumverhältnissen gearbeitet:

25 cm <sup>3</sup>	meist 2 proz. Stärkelösung
10 „	Phosphatgemisch (0,29 mol. Phosphat $p_h = 5,6$ )
1 „	Enzymlösung
36 cm <sup>3</sup>	

Die Versuche werden in 100-cm<sup>3</sup>-Erlenmeyerkolben ausgeführt, die im Wasserbad auf konstanter Temperatur gehalten werden. Das Enzym wird erst zugesetzt, wenn das Stärkephosphatgemisch die Temperatur von 37° angenommen hat. In Zeitintervallen, die mit dem Chronoskop gemessen werden, geschieht die Entnahme von Proben zu je 10 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit; sie werden in 10 cm<sup>3</sup> 5 proz. Sodalösung einpipettiert, wodurch die Reaktion vollständig unterbrochen wird. Die einzelnen Proben werden nach Bertrand titriert.

Es ist darauf zu achten, daß lösliche Stärke kein eindeutig definiertes Substrat ist. Zu vergleichenden Messungen ist deshalb stets dasselbe Substrat gleicher Verarbeitung zu benutzen. Euler<sup>2)</sup> definiert sein Stärkepräparat so, daß 1 g löslicher Stärke aus annähernd gesättigter Jodbenzol-Lösung 18,5% Jod aufnimmt, und zwar nach 45 Min. langem Erhitzen auf 100°. Eine in gleicher Weise durch Erhitzen vorbehandelte Lösung von 1,10% dieser löslichen Stärke in destilliertem Wasser zeigte bei 18° eine relative Viscosität von 1,10.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 112, S. 193 (219). 1920/21.

<sup>2)</sup> Vgl. v. Euler, H. u. K. Myrbäck: Arkiv f. Kemi Bd. 8, S. 1. 1921.

Nach Euler und Svanberg ist die Verzuckerungsfähigkeit pro g Trockengewicht  $Sf = \frac{k \cdot g \text{ Maltose}}{g \text{ Präparat}}$ , wo  $k$  die monomolekulare Verzuckerungskonstante  $= \frac{1}{t} \log \cdot \frac{a}{a-x}$ ,  $g$  Maltose die Anzahl g Maltose bedeutet, die bei der durch  $k$  gemessenen Reaktion in maximo gewonnen werden kann (75<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) und  $g$  Präparat die Menge Enzympräparat, welche im Gesamtvolumen der Reaktionsflüssigkeit gelöst wurde. Für  $k$  nimmt man den Mittelwert aus mehreren Bestimmungen. Für verschiedene Stärkepräparate ist die Spaltbarkeit (und damit  $k$ ) verschieden.

Die Enzymkonzentration soll so gewählt werden, daß bei 0,25—1,0 g Stärke in 36 cm<sup>3</sup> Gemisch bei 37<sup>0</sup>, optimaler Acidität und Anwesenheit eines geeigneten Neutralsalzes die Reaktionskonstanten 0,004—0,08 ergeben; die Konzentration des Phosphatpuffers ist in einem großen Gebiet ohne Einfluß.

Die Beziehung des Willstätterschen Amylase-Wertes (Am.-W.) zu dem Eulerschen Sf. ist folgende: Die beliebigen g Maltose der Eulerschen Formel werden durch die bestimmten der Willstätterschen Größe (75<sup>0</sup>/<sub>0</sub> von 0,25 g Stärke = 0,1875 g = 18,75 cg) dividiert, da der Am.-W. auf Zentigramme berechnet ist, oder mit dem reziproken Wert 0,05333 multipliziert. Also Am.-W. = Sf.  $\times$  0,05333.

#### Bestimmung der Speichelamylase nach Pringsheim und Gorodiski<sup>1)</sup>.

Der Speichel wird nach einem Brotfrühstück nach Verlauf einer Stunde mit Hilfe eines Schwämmchens von ca. 3—5 cm Durchmesser gesammelt. Es kommen 0,5, 2 oder 4 cm<sup>3</sup> Speichel zu 5) cm<sup>3</sup> einer 2proz. Lösung von löslicher Stärke (Kahlbaum) mit 2% NaCl, 20 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer (3,8 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{3}$  molar prim. Kaliumphosphat und 16,2 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{3}$  molar sek. Natriumphosphat:  $p_h = 6,2$ ) bei Gegenwart von etwas Toluol zur Einwirkung. Die Stärkelösung wird auf 37<sup>0</sup> erwärmt und bei dieser Temperatur gehalten. Zur Zuckerbestimmung werden 10 cm<sup>3</sup> der Lösung zu 5proz. Sodalösung gegeben und nach Bertrand titiert.

Bestimmung der Leberamylase nach Holmbergh<sup>2)</sup>: Als Substrat dient eine Mischung von 20 cm<sup>3</sup> 2proz. lösliche Stärke, 10 cm<sup>3</sup> 0,29-n-Phosphatpuffer, 1 cm<sup>3</sup> 1-n-NaCl-Lösung, die mit

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 175. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134. S. 68. 1924.

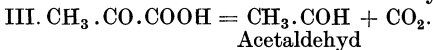
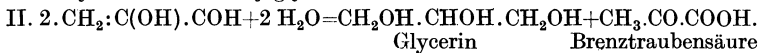
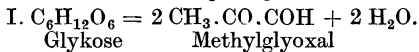
Wasser auf 42 cm<sup>3</sup> aufgefüllt und mit einigen Tropfen Toluol überschichtet werden. ( $p_h = 6,9$ , Temperatur  $37^{\circ} \pm 0,1$ .)

Erlenmeyerkolben von je 100 cm<sup>3</sup> werden mit Puffer, Kochsalzlösung und Wasser versetzt und in den Thermostaten eingehängt. Die Lebersubstanz wird in kleinen Glasröhren (Schiffchen) in Wägeröhren gewogen. Danach läßt man das Schiffchen in den Erlenmeyerkolben hineinfallen und schüttelt. Bei Verwendung frischer Lebersubstanz muß die Zermahlung so fein sein, daß keine größeren Gewebsteilchen in der Suspension mehr umherschwimmen. Es werden 20 cm<sup>3</sup> vorgewärmte Stärkelösung zugesetzt und der Kolben von Zeit zu Zeit umgeschüttelt. Unmittelbar nach Zusatz der Stärkelösung wird eine Probe entnommen und als Blindwert bestimmt. Nach bestimmten Zeitintervallen werden Proben von 10 cm<sup>3</sup> entnommen und der Zucker (nach Enteiweißung) nach Bertrand bestimmt.

### Die Fermente der alkoholischen Gärung.

Die Vergärung von Zucker zu CO<sub>2</sub> und Alkohol als hauptsächliche Endprodukte setzt sich aus einer Reihe von nur z. T. bekannten Reaktionen zusammen.

Ein von Neuberg aufgestelltes Gärschema ist:



Unter welcher Bedingung die Umlagerung der stabilen Hexosen in reaktionsfähigere Körper erfolgt, ist noch nicht sicher. Von Hexosen sind nur 4 Zucker gärfähig: Glucose, Mannose, Fructose und Galaktose. Die Galaktose wird schwerer vergoren als die anderen Hexosen. Nach neueren Untersuchungen von Willstätter werden Saccharose, Laktose und Maltose direkt vergoren<sup>1)</sup>.

### Darstellung von Hefepreßsaft nach Buchner<sup>2)</sup>.

Die aus der Brauerei bezogene Hefe wird gewaschen, indem sie auf ein Haarsieb gebracht und mit Wasser durch das Sieb hindurch in hohe Gefäße geschwemmt wird. Nachdem

<sup>1)</sup> Vgl. Willstätter u. Steibelt: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 211. 1921. Willstätter u. Oppenheimer: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 118, S. 168. Vgl. auch Willstätter u. Bamann: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 152, S. 202. 1926. Ferner Willstätter u. Lowry: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 150, S. 287. 1925.

<sup>2)</sup> Zymasegärung. S. 59. München-Berlin. 1903.

sich die Hefe zu Boden gesetzt hat, hebert man das darüberstehende Wasser ab. Dieser Waschprozeß wird 2—3mal wiederholt, bis das Waschwasser klar und farblos bleibt. Schließlich koliert man die Hefe durch ein Nesseltuch auf einem Filtrierahmen. Zur Entwässerung wird die Hefe in dem gefalteten und zusammengebundenen Koliertuch in ein Preßtuch eingeschlagen und in der hydraulischen Presse bei 50 Atmosphären Druck 5 Min. lang ausgepreßt. Die entwässerte Hefe (noch mit etwa 70% Wassergehalt) wird in einer großen Schale mit feinem Quarzsand und mit Kieselgur oder Infusorienerde im Verhältnis 1000 g entwässerte Hefe, 1000 g Quarzsand und 200—300 g Kieselgur mit den Händen tüchtig gemengt und durch ein großes Sieb (9 Maschen auf 1 cm<sup>2</sup>) geschlagen. Zur Zerreibung kommt das staubtrockene, fast weiße Pulver hierauf in Portionen von 300 bis 400 g in eine große Porzellanschale von 40 cm Durchmesser und wird so lange zerrieben, bis die teigig gewordene Masse sich von selbst zusammenballt und von der Wandung der Reibschale ablöst, was für 300—400 g  $2\frac{1}{2}$ —3 Min. dauert. Zum Auspressen wird die Masse (entsprechend 1 kg Hefe) nunmehr in ein starkes, baumwollenes, nicht appetiertes Preßtuch (Segeltuch) eingeschlagen. Das Preßtuch wird vor dem Gebrauch mit kaltem Wasser gründlich durchtränkt und in der hydraulischen Presse bei 50 Atmosphären Druck von dem Überschuß an Wasser befreit. Hierauf wird das Hefegemisch in der hydraulischen Presse bei einem bis auf 300 Atmosphären steigenden Druck ausgepreßt. Der abfließende Saft tropft durch ein Faltenfilter in ein in Eiswasser stehendes Gefäß. Aus 1 kg Hefe wird so gewöhnlich zwischen 450 und 500 cm<sup>3</sup> Preßsaft gewonnen. Der ausgepreßte Kuchen kann nochmals unter Zusatz von Wasser zerrieben und ausgepreßt werden. Der gewonnene Saft behält nur kurze Zeit seine Aktivität.

#### Darstellung von Acetondauerhefe nach Buchner<sup>1)</sup>.

Frische ausgewaschene Brauereiunterhefe wird bei einem Druck von 50—100 Atmosphären entwässert, 500 g davon zwischen den Händen zu einem groben Pulver verrieben und auf ein Sieb (100 Maschen auf 1 cm<sup>2</sup>) verteilt. Nunmehr wird das Sieb in eine flache Schale, in der sich 3 l Aceton befinden, eingetaucht, und dann wird durch Heben und Senken des Siebes in der Flüssigkeit die Hefe unter Nachhilfe mit einem Bürstchen in 3—4 Min. durch die engen Maschen geschwemmt. Die Hefe bleibt nach dem Eintragen unter häufigem Umrühren noch 10 Minuten im

<sup>1)</sup> Zymasegärung S. 265. Vgl. auch R. Albrecht, E. Buchner und R. Rapp: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 35, S. 2376 (1902).

Aceton liegen. Hierauf wird nach kurzem Absetzen die Flüssigkeit größtenteils abgossen und die Hefe in einer Nutsche auf gehärtetem Filtrierpapier unter kräftigem Anpressen mit einem geeigneten Stempel möglichst trocken abgesaugt. Den daraufhin grob zerkleinerten Hefekuchen übergießt man aufs neue in der Schale mit 1 l Aceton, rührt 2 Min. durch und saugt die Flüssigkeit wieder auf der Nutsche möglichst vollständig ab. Die Masse wird sodann grob gepulvert, in einer kleinen Schale mit 250 cm<sup>3</sup> Äther übergossen, 3 Min. durchgeknetet und auf der Nutsche vom Äther befreit. Hiernach wird die Hefe auf Papier ausgebreitet,  $\frac{1}{2}$ —1 Std. im Zimmer an der Luft gelagert und schließlich durch 24stündiges Erwärmen im Trockenschrank bei 45° völlig getrocknet. Die so gewonnene Acetondauerhefe stellt ein fast weißes, staubtrockenes Pulver dar, das monatelang gut wirksam bleibt.

#### Darstellung von Trockenhefe und Hefesaft nach v. Lebedew<sup>1)</sup>.

Ein Eimer frischer Brauereihefe wird in einem Behälter von mindestens 50 l Inhalt mit langsam fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Von Zeit zu Zeit rührt man die Hefe mit einem Stock um. Man wäscht, bis das Wasser klar und fast ungefärbt ist und läßt darauf die Hefe gut absetzen. Hat man an demselben Tag keine Zeit mehr, um sie abzupressen, so darf man sie für eine Nacht in Wasser liegen lassen. Das obenstehende Wasser dekantiert man und nimmt eine große Eisen-, Porzellan- oder Tonschale, legt ein 5-mm-Sieb darauf, bedeckt es mit einem dünnen Filtertuch und gießt die Hefe darauf. Man läßt abtropfen und preßt in dem zusammengebundenen Filtriertuch mit einer Handpresse, bis die Hefe so trocken ist, daß man sie durch ein 5-mm-Sieb leicht durchsieben kann. Die durchgesiebte Hefe wird in dünner Schicht (1—1,5 cm) im Thermostaten bei 25—30° auf Filtrierpapier trocknen gelassen, wozu 2 Tage nötig sind. Die Temperatur der Trocknung scheint für die Gärkraft der Trockenhefe nicht so wesentlich zu sein, wie sie es für die Gärkraft der aus den Trockenhefen bereiteten Macerationssäfte ist. Mangelhafte Zerteilung der Frischhefe führt bei den langsamen Trockenmethoden zur Knollenbildung; diese müssen durch Absieben entfernt werden. Allzu feine Verteilung der Hefe, wie beim Krause-Verfahren, beeinträchtigt die Haltbarkeit, da die große Ober-

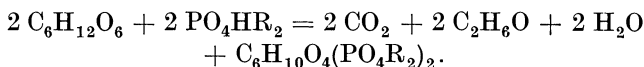
<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 73, S. 447. 1911. Zur Darstellung von Trockenhefe vgl. auch Sobotka, H.: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 10. 1924.

fläche Oxydation und Feuchtigkeitsaufnahme begünstigt [Sobotka<sup>1)</sup>].

Zur Darstellung von wirksamem Hefesaft werden 50 g Hefe mit der 3fachen Menge Wasser in einer kleinen, ca. 500 cm<sup>3</sup> fassenden Porzellan- oder Glasschale mit einem Glasstabe verrührt, bis die Mischung homogen wird, 2 Std. im Thermostaten bei 35° oder 6 Std. bei 25° aufbewahrt und durch ein Papierfaltenfilter filtriert. Im Sommer ist es ratsam, das Filtrat unter Eiskühlung aufzufangen.

Das  $p_h$ -Optimum der Trockenhefegärung liegt nach Euler und Myrbäck<sup>2)</sup> bei  $p_h = 6,5 \pm 0,3$ ; bei  $p_h = 5$  ist die Gärungsgeschwindigkeit nur 50% der maximalen.

Zum Zustandekommen der Gärung ist die Anwesenheit von Phosphat unbedingt notwendig. Der Vorgang läßt sich nach Harden und Young durch die Gleichung darstellen:



Bei Gärungen mit Trockenhefe beginnt erst nach Ablauf einer „Induktionsperiode“ die CO<sub>2</sub>-Entwicklung (Harden und Young). Sie steigt bis zu einem Maximum pro Zeiteinheit; wenn alles freie Phosphat verestert ist, sinkt die CO<sub>2</sub>-Ausscheidung wieder zu einem konstanten Wert (Lebedew, Meyerhof). — Die Zeit, die von Beginn des Versuchs bis zum Erreichen des Maximalwertes an CO<sub>2</sub> verstreicht, nennen Boysen-Jansen die „Aktivierungszeit“. Diese Aktivierung ist nach Meyerhof durch Hexosephosphat bedingt<sup>3)</sup>.

Es sind auch Wasserstoffakzeptoren (z. B. Acetaldehyd) für die Zymasegärung notwendig (Neuberg). — Antiseptica, wie Toluol, hemmen die Gärung in lebenden Hefezellen wie auch die von Trockenhefe sehr stark, nicht aber die Gärung im Hefepreßsaft<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Die Darstellung von guter Trockenhefe scheint am sichersten bei Benutzung von untergäriger Bierhefe zu gelingen. Dagegen hat die Trockenhefe von obergäriger Bierhefe den Vorteil, daß diese an Co-Enzym arm ist. Boysen-Jansen: Biochem. Zeitschr. Bd. 154, S. 236. 1924.

<sup>2)</sup> Euler u. Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 131, S. 179. 1923.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 102, 185, 1918, vgl. auch Euler u. Myrbäck; Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, 264, 1924.

<sup>4)</sup> Vgl. hierzu Buchner: Zymasegärung; Euler, H. u. S. Kullberg: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 73, S. 85, 1911; Euler u. Johansson: Zeitschr. f. Chem. Bd. 85, 204, 1913 ferner Meyerhof: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 102, 185, 1918 und vor allem Dorner, A.: Ebenda Bd. 81, S. 99. 1912.



### Das Co-Enzym.

Gewaschene oder dialysierte Trockenhefe ist entweder überhaupt nicht wirksam oder besitzt nur einen kleinen Teil der ursprünglichen Wirksamkeit. Durch Hinzufügen des Waschwassers oder der Dialysieraußenflüssigkeit kann die ursprüngliche Aktivität wieder hergestellt werden. Aus Hefekochsaft oder nach Meyerhof auch aus Muskelpreßsaft läßt sich ein Stoff gewinnen, durch den die Gärgeschwindigkeit um ein Vielfaches der ursprünglichen ansteigt (Co-Enzym oder Co-Zymase).

Darstellung des Co-Enzyms aus Hefekochsaft. Braucht man ein Co-Zymasepräparat ohne Anspruch auf Reinheit, so genügt es, Hefe mit Wasser einige Minuten zu kochen. Man kann die Mischung entweder direkt oder nach Filtration verwenden. Als Ausgangsmaterial dient am besten ein durch fraktioniertes Fällen von Hefeextrakten durch Alkohol und Äther erhaltenes Co-Zymasepräparat; zwischen 50 und 80 % Alkohol fällt das Co-Enzym ziemlich vollständig aus [Euler und Myrbäck<sup>1)</sup>].

Man kann auch nach Euler und Karlsson<sup>1)</sup> die Hefe in die 10fache Menge kochenden Wassers einrühren, 5 Min. lang kochen, auf 60° abkühlen und diese Temperatur 4 Std. lang halten. Das Filtrat wird wie oben bei 10—15 mm Hg auf ungefähr  $\frac{1}{20}$  des Ausgangsvolumens eingeengt. Diese Lösung wird mit der fünffachen Menge 95proz. Alkohol gefällt. Oder man benutzt Trockenhefe, die mit der 10fachen Menge Wasser bei 60—70° 5 Std. lang gerührt wird. Das Filtrat wird bei einer Temperatur unter 50° und unter vermindertem Druck eingeengt.

Zur gründlichen Reinigung<sup>2)</sup> wird der nicht eingeengte Kochsaft durch Zentrifugieren von Hefeschlamm befreit und mit Pb-Acetat versetzt (zu Kochsaft aus 5 kg frischer Hefe wird etwa 200 g kristallisiertes Salz genommen);  $p_h$  etwa 6. Nach Filtration wird die bleihaltige Lösung mit Thymolphthalein und NaOH bis zur schwachen Blaufärbung versetzt. Die schwere Fällung setzt sich bald zu Boden. Die größte Menge der Flüssigkeit, etwa 30 l, wird abdekantiert, der Rest wird scharf (8000 Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Bleiniederschlag wird mit Wasser geknetet und durch ein feines Sieb getrieben und in die Suspension unter Turbinieren ein kräftiger Strom  $H_2S$  geleitet. Ist das Blei vollständig in Sulfid umgewandelt, wird filtriert und das Filtrat auf etwa 500 cm<sup>3</sup> im Vakuum eingeengt. Mit dem eingeengten Filtrat

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 131, S. 182; vgl. jedoch Euler u. Karlsson: Ebenda: Bd. 123, S. 99. 1922.

<sup>2)</sup> Euler u. Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 138, S. 1, 1924 u. Bd. 139, S. 281. 1924.

wird eine nochmalige Bleifällung mit möglichst wenig Salz vorgenommen und die Lösung wieder konzentriert.

Aus dieser Lösung wird die Co-Zymase bei  $p_h =$  etwa 6 mit 20% Kieselwolframsäure gefällt. (Auch mit Tannin — 5 proz. Lösung — erhält man wirksame Niederschläge.) Der Niederschlag wird mit destilliertem Wasser tüchtig verrieben und danach vorsichtig Barytwasser zugegeben. Anfangs löst sich der Niederschlag, und die Flüssigkeit färbt sich gewöhnlich bläulich, bei weiterem Zusatz von Baryt beginnt das weiße Bariumphosphorwolframat auszufallen. Man fährt sehr vorsichtig so lange mit dem Barytzusatz fort, als noch eine Fällung entsteht und die Flüssigkeit eben noch rotes Lackmuspapier bläut. Sie darf aber nicht so alkalisch werden, daß Phenolphthalein gefärbt wird.

Darstellung des Co-Enzyms nach Boysen-Jensen. Abgepreßte obergärige Hefe<sup>1)</sup> wird mit dem halben Gewicht Wasser versetzt. Nach 24 Std. wird das Ganze auf 60—70° erhitzt, nach Abkühlung filtriert, das Filtrat im Vakuum bei 50—60° zu Syrup eingengt.

#### Co-Zymase aus Muskelkochsaft nach Meyerhof<sup>2)</sup>.

Hinterbeine von Frosch, Ratte oder Kaninchen werden fein zerschnitten, mit dem gleichen Gewicht destillierten Wassers versetzt und zum Kochen erhitzt. Der Extrakt („Muskelkochsaft“) wird abfiltriert. Das Kochen ist unerlässlich.

#### Co-zymasefreie Hefe.

Zur Untersuchung auf Co-Zymase muß eine Hefe genommen werden, die durch Waschen oder Dialysieren von Co-Enzym befreit ist.

Nach Meyerhof<sup>3)</sup> wird Hefemacerationssaft von Lebedew (siehe S. 181) durch eine Zsigmondysche Nutsche, die aus Kollodium mit 96% Alkohol hergestellt ist, ultrafiltriert. Frische Filter sind am wirksamsten. Zur vollständigen Entfernung des Co-Fermentes muß der Rückstand auf dem Filter mit destilliertem Wasser so lange gewaschen werden, daß eine mindestens 1000fache Verdünnung der dialysierten Bestandteile des Rückstandes eintritt. Zur Prüfung der Abwesenheit des

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 154, S. 237. 1924. Euler u. Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 136, S. 107. 1924. Bd. 139, S. 284. 1924.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 101, S. 165. 1917. Bd. 102, S. 3, 1918.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 101, S. 165 und Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 170, S. 367.

Co-Fermentes ist es nach Harden<sup>1)</sup> vorteilhaft, die Gärfähigkeit auf Fructose allein und mit geringen Mengen von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zu prüfen. Zusatz einer ganz geringen Menge von hexosediphosphorsaurem Natrium leitet bei Anwesenheit schon von sehr wenig Co-Enzym die Gärung ein (Meyerhof). Euler und Myrbäck<sup>2)</sup> bereiten ein zu Co-Zymasebestimmungen geeignetes Hefepreparat, indem sie untergärige Bierhefe (einige kg) waschen, trocknen und die getrocknete Hefe in verschlossenen Flaschen aufbewahren.

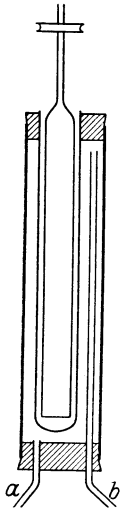


Abb. 56.

Zu jeder Versuchsreihe wird eine passende Hefemenge (10 g) abgewogen. Die Hefe wird mit Wasser verrieben, quantitativ in eine geräumige Flasche gespült, die Flasche kräftig geschüttelt, die Hefe abzentrifugiert, wieder in Wasser aufgeschlämmt, geschüttelt, abzentrifugiert. Die Hefe wird jetzt in etwas Wasser aufgenommen, quantitativ in einen 100-cm<sup>3</sup>-Meßkolben gespült, mit Wasser oder Phosphatlösung auf 100 cm<sup>3</sup> verdünnt. Mit einer Pipette können die gewünschten Hefemengen, die beinahe frei von Co-Zymase sind, in die Gärkolben gebracht werden. In dem Beispiel von Euler und Myrbäck betrug das Volumen der Gär- lösung 20 cm, die Temperatur 30°, die Phosphatmenge 0,35 g  $\text{PO}_4$ , die Traubenzuckermenge 1,0 g; die Lösung wurde zuerst mit  $\text{CO}_2$  gesättigt; die entwickelte  $\text{CO}_2$  wurde über Quecksilber aufgefangen und das Volumen bei Zimmertemperatur gemessen.

Darstellung nach Boysen-Jensen<sup>3)</sup>. Es wird obergärige Hefe benutzt, die meistens ärmer an Co-Enzym ist. Der Macerationssaft (durch Extraktion der getrockneten Hefe mit 3 Teilen Wasser bei 35 bis 40° in 2 Std. dargestellt) wird in Kolloidumhüllen nach Sörensen dialysiert (Abb. 56). Eine breite Kolloidumhülle wird in ein Gefäß eingehängt, das mit destilliertem Wasser durchspült wird (Einfluß unten, Abfluß oben). Die Flüssigkeit innerhalb der Hülle wird durch einen Rührer dauernd bewegt. Die Dialyse soll möglichst schnell vonstatten gehen. Sie soll 24 Std. nicht überschreiten. Die Temperatur wird auf 0—5° gehalten.

Boysen-Jensen ermittelt in folgender Weise den Co-Enzymgehalt seiner Zymase (Die Zymase wurde dargestellt durch Fällung des dialysierten Macerationssaftes mit 8 Teilen 96 proz. Alkohol und 4 Teilen Äther; der Niederschlag wurde abgenutscht

<sup>1)</sup> Alcoholic Fermentation. S. 64. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 131, S. 181. 1923.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 154, S. 235. 1924.

und mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen, und im Vakuum über  $H_2SO_4$  getrocknet.): Es wird eine Mischung von 0,5 g Zymase + 0,5 g Dextrose + 0,5 mg mol. Hexosephosphat<sup>1)</sup> (in 5 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst) + 2 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{7}$  molar. sekund. Kaliumphosphatlösung + 3 cm<sup>3</sup> 1 proz. Acetaldehydlösung bereitet und die bei 25° in 10 Min. entwickelte CO<sub>2</sub> bestimmt. Diese darf höchstens 1 mg betragen.

Zur Messung der Co-Enzymwirkung bestimmten Euler und Karlsson<sup>2)</sup> die Gärungsgeschwindigkeit, ausgedrückt durch die pro Stunde entwickelte Anzahl cm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub>. Die Aktivität des Co-Enzympräparates (ACo) beziehen sie auf die Gewichtseinheit:

$$ACo = \frac{\text{cm}^3 \text{CO}_2 / \text{Stunde}}{\text{g Co-Enzympräparat (Trockengew.)}}$$

#### Bestimmungsmethoden.

Als Methoden zur Bestimmung des Gärverlaufs kommen hauptsächlich 2 Gruppen in Frage. 1. Die Bestimmung des restierenden Zuckers (titrimetrisch und polarimetrisch) und 2. die Messung der entwickelten CO<sub>2</sub>. Bei Gärungsversuchen im alkalischen Gebiet ist zu beachten, daß die CO<sub>2</sub> als Bicarbonat oder Carbonat gebunden wird.

Die CO<sub>2</sub> wird meistens gasvolumetrisch gemessen. Die Messung im Schrötter- oder Einhorn-Saccharometer ist ungenau [Willstätter-Steibelt<sup>3)</sup>]. Das Gas wird meistens über Hg aufgefangen, doch dürfte mit CO<sub>2</sub> gesättigtes Wasser, das mit einer Schicht Erdöl bedeckt ist, für die meisten Zwecke genügen [Heyduck<sup>4)</sup>].

Bestimmung nach Willstätter und Steibelt<sup>3)</sup>. Als Gäransatz dienten 20 cm<sup>3</sup> einer 5proz. Lösung von Glucose mit einer 0,2 g trockener Hefe entsprechenden Menge frischer Hefe. Sättigung der Lösung mit CO<sub>2</sub> bei der Versuchstemperatur, Anwendung von Nährstoffen (siehe S. 186), konstante Temperatur, gelindes Schütteln des Gärgefäßes. Die Halbgärmenge (siehe S. 191), der Kohlensäure bei Zimmertemperatur (20°) und 720 mm Druck beträgt 144 cm<sup>3</sup>.

<sup>1)</sup> Dargestellt nach Harden und Young (vgl. S. 188) über das Bariumsalz. Aus dem Bariumsalz wurde das Kaliumsalz durch Umsetzung von 1,22 g Bariumhexosephosphat mit 0,7 g Kaliumsulfat unter Zusatz von 10 cm Wasser dargestellt; 5 cm der filtrierten Lösung enthalten dann 1 mg Molekel, die Lösung ist somit  $\frac{1}{5}$  mol.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 123, S. 92.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 219. 1921.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. Spiritusind. 1882, S. 226, zit. nach Oppenheimer: Die Fermente, S. 370.

Für vergleichende Untersuchungen sollen die Hefen möglichst unter gleichen Bedingungen gehalten werden (gleiche Ernährung, Vorbehandlung, Lagerung). Als Nährstoffe verwenden Willstätter und Steibelt auf 0,2 g trockene Hefe

0,25 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
 0,2 g Acetamid oder 0,25 g Pepton,  
 0,025 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  und  
 0,01 g  $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ .

Das Schütteln der Gefäße wird durch eine Wasserturbine oder einen kleinen Elektromotor besorgt.

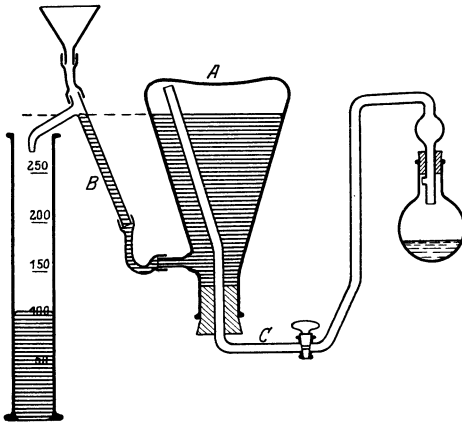


Abb. 57.

Apparatur: Durch das entwickelte  $\text{CO}_2$  wird Hg verdrängt, das in einem Meßzylinder aufgefangen wird. Der Gasometer besteht aus einer umgedrehten, mit einem Gummistopfen durch Drahtligatur verschlossenen Saugflasche A (siehe Abb. 57). Sie ist durch einen möglichst kurzen Gummischlauch mit dem beweglichen Glasrohr B verbunden,

von dem ein nach unten umgebogenes Ablaufrohr abgezweigt ist. Durch den Gummistopfen ist das mit einem Glashahn versehene Rohr C bis ganz oben in den möglichst vollständig mit Hg gefüllten Gasometer eingeführt. Das obere Ende der Glasröhre muß zur Seite (links in der Abbildung) gebogen sein, damit, wenn einmal Hg hineingelangt, dieses durch Neigen des Apparates durch den Hahn abgelassen werden kann. Der Apparat wird durch B mit Hg gefüllt; er wird, während der Hahnstopfen entfernt ist, mit dem Gärkolben verbunden. Der Druck ändert sich beim Auffangen der Kohlensäure beträchtliche Zeit nur wenig, später wird er durch Neigen des beweglichen Rohres B ausgeglichen.

Harden, Thomson und Young<sup>1)</sup> verbinden die Flasche mit der Gärflüssigkeit mit einem mit Hg gefüllten Azotometer und messen das entwickelte Gas, nachdem die Flüssigkeit vorher mit  $\text{CO}_2$  gesättigt wurde. Das Quecksilberniveau im Reservoir wird

<sup>1)</sup> Harden: Alcoholic Fermentation. S. 28.

durch einen Überlauf konstant gehalten, wie es aus der Abb. 58 ersichtlich ist. Vor der Ablesung soll das Gärgemisch energisch geschüttelt werden. Nach dem gründlichen Schütteln wird die Flasche in den Thermostaten zurückgebracht, man wartet eine Minute und liest dann den Stand des Quecksilbers im Azotometer ab. Die Ablesungen können alle 3—4 Minuten wiederholt werden.

Auch Euler und Josephson<sup>1)</sup> benutzen als Gäransatz die Vorschriften von Willstätter und Steibelt. Als Hefe dient Frischhefe (*Saccharomyces Marxianus*). Die Gärkölbchen befinden

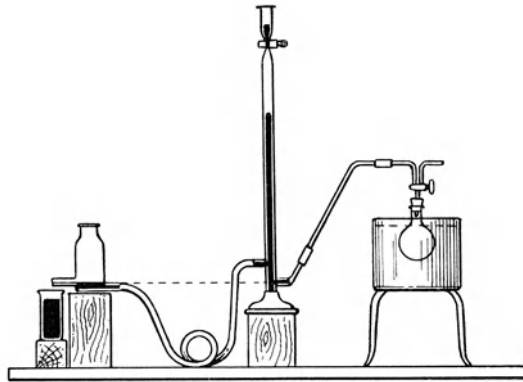


Abb. 58.

sich in Thermostaten von  $30^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$ . Sie enthalten  $25 \text{ cm}^3$  Lösung mit einem Gehalt von  $4\%$  Hexose, also im ganzen  $1 \text{ g}$  Zucker, ferner rund  $2\%$   $\text{PO}_4$  als gemischtes Phosphat von der Acidität  $p_h = 4,5$ . Die Hefemenge entspricht  $0,2 \text{ g}$  trockener Hefe. Das entwickelte  $\text{CO}_2$  wird unter Schütteln durch Capillarröhren in fein geteilte Büretten geleitet und diese mit dem natürlichen Feuchtigkeitsgrad bei  $17^{\circ}$  und Atmosphärendruck gemessen. Die Halbgärmenge unter den geschilderten Bedingungen ( $17^{\circ}$ ,  $760 \text{ mm}$ ) ist  $136 \text{ cm}^3$ .

Bestimmung nach Warburg-Dorner<sup>2)</sup> und Meyerhof<sup>3)</sup> zugleich zur Methodik der Prüfung auf Co-enzymfrei ausgewaschene Hefe (vgl. S. 183). Als Apparate dienen Barcroftsche Blutgasometer. Die entwickelte  $\text{CO}_2$  wird durch die Druckzunahme gemessen, die eine bestimmte Menge Hefesuspension

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 120, S. 42. 1922.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 81, S. 99. 1912. Vgl. auch Warburg: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 76, S. 331. 1911.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 102, S. 185. 1917.

oder Preßsaft in dem geschlossenen Raum des Apparates erzeugt. Als Sperrflüssigkeit wird die Brodiesche Lösung (vgl. S. 106) benutzt. Die Kohlensäuremenge in Kubikzentimetern ( $0^0$  760 mm) wird nach der Formel berechnet:

$$\text{CO}_2! = \frac{pv}{10000 (1 + \alpha t)} + \frac{a p F}{10000}$$

wo  $p$  die Druckzunahme in mm Manometerflüssigkeit (10000 = 1 Atmosphäre) bedeutet,  $v$  Volumen des Gasraumes der Gärungsgefäße,  $F$  angewandte Flüssigkeitsmenge (z. B. 1,2 cm<sup>3</sup>)  $a$  Absorptionskoeffizient für Kohlensäure (bei  $25^0 = 0,76$ ).

Bei den Untersuchungen von Meyerhof<sup>1)</sup> wurde der Hefemacerationssaft nach Lebedew benutzt. 0,5—0,6 cm<sup>3</sup> Saft wurden durch Zusätze auf 1,0—1,2 cm<sup>3</sup> gebracht. Die Druckzunahmen wurden alle 10—20 Min. gemessen. Es wurde eine größere Menge Phosphat zugegeben (0,1 cm<sup>3</sup> molar oder halb-molar KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), am Anfang daher eine starke Steigerung der Gärung, die nach 1—2 Std. abfiel.

Anmerkung: Darstellung der hexosephosphorsauren Salze.

Das Hexosephosphat (Zymophosphat, Euler und Fodor) wird meist als Na-Salz benutzt, indem nach Meyerhof<sup>1)</sup> das Calciumsalz mit Na-Oxalat umgesetzt wird. Als Ca-Salz wird „Candiolin“ (Fr. Bayer u. Co.) benutzt. Zur Herstellung der Lösung wird<sup>2)</sup> 4 proz. Ca-Hexosephosphat (0,8 g) mit Na-Oxalat (0,4 g) geschüttelt und nach 3—6 Std. filtriert.

Die Darstellung des Bleisalzes des Hexosediphosphats erfolgt nach Harden<sup>3)</sup> wie folgt: Festes Bariumacetat in einer dem Natriumphosphat entsprechenden Menge wird während der Gärung der Lösung hinzugefügt und gelöst, die Lösung mit Baryt gegen Phenolphthalein eben alkalisch gemacht und mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt. Der Niederschlag wird nach Stehen über Nacht abfiltriert, mit 70 proz. Alkohol gewaschen, mit siedendem absolutem Alkohol behandelt. Die unreinen Bariumsalze werden mit 10 Teilen kalten Wassers gewaschen, wodurch das Bariumhexosemonophosphat in Lösung geht. Der Rest wird mit 200 Teilen Wasser gewaschen, wodurch das Bariumhexosediphosphat

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 102, S. 1. 1918.

<sup>2)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 170, S. 454.

<sup>3)</sup> Alcoholic Fermentation. S. 48.

gelöst wird. Die Hexosediphosphorsäure wird als Bleisalz durch Zusatz von Bleiacetat niedergeschlagen, der Niederschlag wird filtriert oder zentrifugiert, dann gewaschen. Der Bleiniederschlag wird in Wasser suspendiert, mit  $H_2S$  zersetzt, das Filtrat im Luftstrom von  $H_2S$  befreit, endlich mit Soda neutralisiert. Spuren von freiem Phosphat sind in diesem Stadium durch Fällung mit Magnesiumacetat entfernbare. Die Bleifällung wird zweimal wiederholt. Man erhält das Salz von der Zusammensetzung  $C_6H_{10}O_4(PO_4Pb)_2$ . — Der erste wässrige Auszug, der das lösliche Bariumhexosemonophosphat enthält, wird mit basischem Bleiacetat behandelt, das unlösliche basische Bleisalz wird filtriert, gewaschen, mit  $H_2S$  zersetzt, vom Bleisulfid abfiltriert, das Filtrat mit Baryt gegen Phenolphthalein neutralisiert. Man filtriert nun wiederholt die Fällung mit dem basischen Bleisalz. Weitere Reinigung erzielt man durch Zusatz von Quecksilberacetat zu der filtrierten Lösung des Bariumsalzes in 10% Alkohol und neuerliche Fällung des Bleisalzes im Filtrat. Das Bariumsalz wird endlich wiederholt in 10 proz. Alkohol gelöst und das Filtrat mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt.

Lebedew<sup>1)</sup> behandelt die gekochte und filtrierte Gärungsflüssigkeit (dargestellt aus 150 g Trockenhefe in 1 l Wasser, 210 g Rohrzucker, 105 g eines Gemisches von 2 Teilen  $Na_2HPO_4$  und 1 Teil  $NaH_2PO_4$ ) mit dem gleichen Volumen Aceton. Die ausgeschiedene dicke, braune Flüssigkeit wird, nachdem die überstehende Schicht abgossen und Wasser zugefügt wurde, noch 2—3 mal mit Aceton behandelt. Zu der so gereinigten, dicken gelben Flüssigkeit wird eine konzentrierte warme Lösung von Bleiacetat unter Umrühren hinzugefügt. Es bildet sich sogleich eine gelbliche, dicke Masse. Sie wird auf der Nutsche abgesaugt, mit schwacher Bleiacetatlösung ausgewaschen, bis das Filtrat wasserklar ist und Fehlingsche Lösung nach Entfernung des Bleis nicht mehr reduziert wird. Der ausgewaschene weiße Niederschlag wird in einer Porzellanschale mit Wasser verrieben, man schüttelt 1 Std. im Schüttelapparat, zersetzt mit  $H_2S$ , vertreibt den  $H_2S$  durch Durchleiten von Luft, setzt Tierkohle zu und filtriert. Nimmt man auf 200—250  $cm^3$  des Filtrates 20 g Phenylhydrazin und ebensoviel 50 proz. Essigsäure und erwärmt man auf dem Dampfbade zum Sieden, so wird eine vollständige Umwandlung des Esters in das entsprechende Osazon herbeigeführt, das sich in der Kälte ausscheidet.

Es sei hier noch die Reinigung des käuflichen hexosephosphor-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 28, S. 226. 1910.



sauren Calciums (Candiolin) nach Neuberg und Sabetay<sup>1)</sup> mitgeteilt. 10 g Candiolin werden in 64 cm<sup>3</sup> 2nHCl unter Zusatz von 50 cm<sup>3</sup> Wasser in der Kälte gelöst, und dazu, ohne zu filtrieren, unter Eiskühlung 65—66 cm<sup>3</sup> 2nNaOH tropfenweise hinzugegeben. Beigemengte Phosphate (und eventuelle Spuren von hexosediphosphorsaurem Calcium) fallen dabei unlöslich aus, von letzterem jedoch nur wenig, da das Hexosediphosphat in kaltem Wasser löslich ist. Man saugt ab, neutralisiert genau mit Salzsäure. Die klare Lösung wird dann auf dem Wasserbade bis auf 70° erhitzt, wobei sich das Calciumhexosediphosphat in gut filtrierbarer Form abscheidet. Dasselbe wird abgesaugt und auf der Nutsche mit heißem Wasser ausgewaschen. Wenn keine eisgekühlte Lösung in verdünnter Säure nach gehöriger Verdünnung und Neutralisation durch Ammoniak mit Magnesiamixtur keine Fällung mehr gibt, ist das Salz rein.

Eine lösliche Modifikation, die namentlich für enzymatische Studien sehr brauchbar ist, gewinnt man wie folgt (Neuberg und Sabetay: l. c.): Das reine hexosediphosphorsaure Calcium wird in möglichst wenig verdünnter Milchsäure gelöst, mit Ammoniak unter Eiskühlung bis zur deutlichen Alkalinität auf Lackmus versetzt; man filtriert, fällt mit Alkohol. Die amorphe, voluminöse Masse wird auf der Nutsche mit Alkohol bis zur Entfernung von Ammoniak und dem auch im starken Alkohol leicht löslichen Ammoniumlactat gewaschen. Dieses mit Alkohol und Äther gewaschene, an der Luft getrocknete Salz löst sich glatt in Eiswasser.

Aus der unlöslichen Modifikation des Calciumsalzes kann man das lösliche Kaliumsalz so bereiten, daß man eine wässrige Suspension mit etwas weniger als der berechneten Menge Dikaliumoxalat digeriert. Das Ende der (durch Schütteln unterstützten) Umsetzung erkennt man an dem Verschwinden der Oxalationen.

Will man das Magnesiumsalz herstellen, das löslicher als die Calciumverbindung und weniger zersetzlich als die hexosediphosphorsäuren Alkalien ist, so behandelt man die wässrige Suspension des reinen Ca-Salzes mit der äquivalenten Menge wässriger Oxalsäurelösung bis zum Verschwinden der Oxalat-Ionen. Nach Filtration des Calciumoxalats neutralisiert man mit reinem Magnesiumoxyd. Man leitet CO<sub>2</sub> ein, filtriert, gießt in die 4fache Menge absoluten Alkohol. Das Magnesiumhexosediphosphat fällt dabei

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 161, S. 240. 1925. Vgl. auch C. Neuberg und E. Reinfurth: Biochem. Zeitschr. 146, S. 589, 1924 (Darstellung des Phenylhydrazinsalzes des Hexosephosphorsäureosazons aus hexose-monophosphorsaurem Barium).

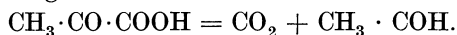
als körnige Masse aus, die abgesaugt wird. Man reinigt durch Lösen in Eiswasser und Fällen mit Alkohol.

#### Maßeinheit.

Nach Willstätter und Steibelt<sup>1)</sup> wird die Gärwirkung durch die Halbgärzeit ausgedrückt, d. h. durch die Anzahl Minuten, die zur Entbindung von 50<sup>0</sup>/<sub>0</sub> der theoretischen CO<sub>2</sub>-Mengen unter den oben (siehe S. 185 und 187) geschilderten Bedingungen nötig sind.

#### Carboxylase.

Die Carboxylase ist nach Untersuchungen von Neuberg und Mitarbeitern ein Teilferment der Zymase. Überall, wo Zymase vorkommt, findet sich auch die Carboxylase. Sie katalysiert den Zerfall der Brenztraubensäure in CO<sub>2</sub> + Acetaldehyd nach folgender Gleichung:



Sie wirkt ebenso auf eine große Reihe anderer aliphatischer und aromatischer Ketonsäuren<sup>2)</sup>.

Die Brenztraubensäuregärung ist gegenüber der Zymasegärung durch ihre größere Widerstandsfähigkeit gegen alle äußeren Eingriffe gekennzeichnet. So z. B. wirkt sie noch in durch Erhitzen auf 51<sup>0</sup> inaktivierten Hefesäften.

Auch ausgegorene und inaktivierte Säfte zeigen Carboxylasewirkung, da die Carboxylase des Co-Ferments zu ihrer Wirkung nicht bedarf. Auch gegen Gifte ist die Carboxylase weniger empfindlich als die Zymase.

Bei zellfreien Gärungen wird zur Pufferung ein Gemisch von m-Brenztraubensäure und m-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> im Verhältnis von 2 : 3 angewandt ( $p_h = 5,32$  bis  $5,50$ ). Am Ende der Gärung steigt der  $p_h$  infolge der CO<sub>2</sub>-Abspaltung auf  $p_h = 5,82$  bis  $6,20$  [Neuberg und May<sup>3)</sup>.] (Die mit frischen Hefen angestellten Versuche sind bei der sauren Reaktion vorgenommen worden, wie sie einer etwa  $\frac{1}{10}$ -n-Brenztraubensäurelösung eigen ist.)

Bestimmung: Als Enzympräparat können alle Hefen und Hefepreparate dienen, die Zymase enthalten.

Die Bestimmungsmethoden für die entwickelte Kohlensäure sind die gleichen wie die oben geschilderten CO<sub>2</sub>-Bestimmungsmethoden.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 211. (219) 1921.

<sup>2)</sup> Vgl. Neuberg, C.: Biochem. Zeitschr. Bd. 71, S. 1. 1915

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 299 (304).

Bestimmung des Acetaldehyds<sup>1)</sup>.

Prinzip: Der entwickelte Acetaldehyd wird durch Zugabe von  $\text{NaHSO}_3$  gebunden. Darauf wird mit Wasserdampf der Aldehyd aus dem mittels Calciumcarbonat zersetzten Aldehydsulfit-Doppelsalz abdestilliert. Zu dem Destillat, das zur Reinigung 3mal redestilliert wird, kommt Hydroxylamin-Schwefelsäure, wodurch das Oxim und freie Schwefelsäure entstehen. Die entstehende freie Säure wird mit  $n/10$  NaOH und Methylorange als Indicator titriert. Der Leerverbrauch der Hydroxylamin-Schwefelsäure an NaOH wird in einem Kontrollversuch ermittelt.

Die Methode zeigt für die für tierische Organe in Betracht kommenden Mengen einen Verlust von etwa 9—10%.

Neuberg und Gottschalk fanden, daß die Acetaldehydmengen bedeutend ansteigen, wenn Insulin dem Gemisch von Leberbrei und sekundärem schwefligsaurem Kalk beigegeben wird (vgl. Beispiel S. 193). Hier sei das Verfahren unter Benutzung dieses Befundes (für Warmblüterorgane) mitgeteilt.

Ausführung: Es werden drei Ansätze gemacht. Der erste dient als Kontrolle. Durchschnittlich werden 33 g Leberbrei genommen, der in 100  $\text{cm}^3$  einer Tyrode-Phosphatlösung<sup>2)</sup> suspendiert wird. Die Phosphatlösung enthält 5,0  $\text{cm}^3$   $m/3$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 2,0  $\text{cm}^3$   $m/3$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  auf 100  $\text{cm}^3$ ,  $p_h = 6,5$ . Dazu kommt 1  $\text{cm}^3$  Insulin (Brand), sowie 2 g frisch gefälltes Calciumsulfit. Ansatz 2 und 3 enthalten die gleichen Bestandteile und außerdem noch 1 g des auf die Fähigkeit zur Aldehydbildung zu prüfenden Stoffes (vgl. Beispiel S. 193). Jeder der drei Ansätze wird gut durchgeschüttelt, in einen Brutschrank von 40° gestellt und des öfteren unter Lüften umgeschwenkt. Nach 2 $\frac{1}{2}$  Std. wird zu jeder Portion noch 0,5  $\text{cm}^3$  Insulin gegeben. Die Ansätze bleiben im ganzen 5 Std. im Thermostaten. Nach dieser Zeit wird die Aufschwemmung in einen zweihalsigen Destillationskolben (nach Claisen) übergeführt. Es werden 3 g Calciumcarbonat hinzugegeben. Mit 10  $\text{cm}^3$  Wasser wird nachgespült. Der Destillationskolben ist einerseits mit einem Dampfentwickler verbunden und andererseits mit einem absteigenden Energiekühler aus Glas, dessen unteres Ende in einen 2  $\text{cm}^3$   $\text{H}_2\text{O}$  enthaltenden 25- $\text{cm}^3$ -Meßzylinder eintaucht. Diese Vorlage befindet sich in Eis, der Claisenkolben in einem Kochsalzbade.

<sup>1)</sup> Neuberg u. Gottschalk: Biochem. Zeitschr. Bd. 146, S. 164 u. 582.

<sup>2)</sup> Zusammensetzung der Tyrode-Lösung: NaCl 8 g, KCl 0,2 g,  $\text{CaCl}_2$  0,2 g, MgCl 0,1 g,  $\text{NaHCO}_3$  1 g (dann in der ursprünglichen Vorschrift  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 g, Glucose 1 g), dest. Wasser zu 1 Liter. Der ohne besondere Zusätze (z. B. Hexosephosphorsäure, d-Fructose, -d-Glucose) im überlebenden Gewebeprei auftretende Acetaldehyd ist auf präformiertes Glykogen zurückzuführen.

Der Schlauch zwischen Destillationskolben und Dampfentwickler wird zunächst mit einer Klemmschraube verschlossen. Nunmehr hält man das Kochsalzbad 10 Min. im Sieden, leitet durch die koagulierte Masse nach Öffnung des Quetschhahns Wasserdampf und treibt im ganzen 25 cm<sup>3</sup> in die Vorlage über. Da häufig etwas H<sub>2</sub>S (vermutlich aus den Sulphydrylverbindungen der Gewebsproteine herstammend), sich mit verflüchtigt, wird das Destillat unter Zugabe von 2 Tropfen Bleiessig im Kühlsysteme rektifiziert, und zwar diesmal durch direkte Destillation auf dem Drahtnetz (ohne Dampf). Um das NH<sub>3</sub> abzufangen, das sich bei der stattfindenden Autolyse auch entwickeln kann, wird noch ein drittes Mal über H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 Tropfen einer 10 proz. Lösung) destilliert.

Einige Tropfen des Destillates müssen sich mit 2 Tropfen frisch bereiteter Nitroprussidnatriumlösung und 0,25 cm<sup>3</sup> 3 proz. Piperidins tiefblau färben (Acetaldehydreaktion nach Rimini).

Die Bildung von Acetaldehyd in den Gewebszellen von Leber und Muskulatur warmblütiger Tiere läßt sich nach Neuberg und Gottschalk<sup>1)</sup> gut, wie folgt, demonstrieren. Die Leber (etwa 12 g) oder etwa 24 g Hinterschenkelmuskulatur eines soeben entbluteten Meerschweinchens werden sogleich nach Entnahme mit einer Schere so fein wie möglich zerkleinert und in 40 bzw. 60 cm<sup>3</sup> 0,9 proz. NaCl-Lösung suspendiert. Nach Zusatz von 3 g frischgefälltem Calciumsulfid (CaSO<sub>3</sub> + 2 H<sub>2</sub>O) und 1 cm<sup>3</sup> Toluol oder Optochin<sup>2)</sup> (0,7g) bleibt das gut umgeschüttelte Gemenge in einer mit Wattebausch verschlossenen Glasflasche 24 Std. bei 37° stehen und wird während dieser Zeit wiederholt durchgeschüttelt. Die Aufschwemmung wird dann in einen Claisenkolben übergeführt und, wie oben beschrieben, weiter verarbeitet.

Beispiele: I. 50 g Leberbrei + 150 cm<sup>3</sup> Tyrodephosphatlösung ( $p_h = 6,5$ ) + 2,0 g Calciumsulfid; 5 Std. bei 40°.

Menge des gebildeten Acetaldehyds 1,37 mg. Derselbe Ansatz + 1 cm<sup>3</sup> Insulin, nach 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. Zusatz von weiteren 0,5 cm<sup>3</sup> Insulin.

Menge des gebildeten Acetaldehyds: 3,29 mg.

II<sup>3)</sup>. 1. Ansatz. 26 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100 cm<sup>3</sup> Tyrodephosphatlösung ( $p_h = 6,5$ ) + 1 cm<sup>3</sup> Insulin (Brand) und 2,0 g Calciumsulfid, 40°.

Nach 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. Zugabe von 0,5 g Insulin. Nach 5 Std. Destillation über 5 g CaCO<sub>3</sub>.

<sup>1)</sup> Klin. Wochenschr. Bd. 2, S. 1458. 1923.

<sup>2)</sup> Bei kurzdauernden — 5 stündigen — Versuchen ist die Zugabe eines Desinfiziens nicht nötig. Bei Anwendung der Optochinbase fügt Neuberg zu der Aufschwemmung außer Calciumcarbonat noch 5 g kristallisiertes Calciumchlorid.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 146, S. 179.

Redestillation über 5 Tropfen verd.  $H_2SO_4$ .

Redestillation über 0,3 g  $PbCO_3$ .

Vorlage 2 cm<sup>3</sup> Wasser, Destillat, 15,0 cm<sup>3</sup>.

Probe nach Rimini (im aliquoten Teil) ++

12,0 cm<sup>3</sup> Destillat + 1,0 cm<sup>3</sup> 2 proz.  $(NH_2OH)_2H_2SO_4$ -Lösung,

Nach 60 Min. bei 30°.

Verbraucht 0,17 bis 0,07 = 0,10 cm<sup>3</sup> n/10 NaOH.

Acetaldehyd =  $0,10 \cdot 4,4 \cdot \frac{5}{4} = 0,55$  mg.

2. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g Glykogen. Aufarbeitung wie unter 1.

Destillat 15,0 cm<sup>3</sup> Probe nach Rimini ++++

12,0 cm<sup>3</sup> Destillat + 1,0 cm<sup>3</sup> 2 proz.  $(NH_2OH)_2H_2SO_4$ -Lösung, nach 60 Min. bei 30°.

Verbraucht 0,34 — 0,07 = 0,27 cm<sup>3</sup> n/10 NaOH.

Acetaldehyd =  $0,27 \cdot 4,4 \cdot \frac{5}{4} = 1,485$  mg.

3. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g  $\alpha$ -Alanin. Aufarbeitung wie unter 1.

Destillat 15,0 cm<sup>3</sup>. Probe nach Rimini ++++

12,0 cm<sup>3</sup> Destillat + 1,0 cm<sup>3</sup> 2 proz.  $(NH_2OH)_2H_2SO_4$ -Lösung, 60 Min. bei 30°.

Verbraucht 0,32 — 0,07 = 0,25 cm<sup>3</sup> n/10 NaOH.

Acetaldehyd =  $0,25 \cdot 4,4 \cdot \frac{5}{4} = 1,375$  mg.

### Glykolyse.

Bestimmung der Glykolyse. Als Bestimmungsmethoden kommen in Betracht: 1. Die Bestimmung des restierenden Zuckers und 2. die Bestimmung der gebildeten Milchsäure. Letztere kann durch chemische Methoden oder gasvolumetrisch bestimmt werden.

Bestimmung der Milchsäure im Muskelgewebe nach Fürth-Charnas, Ripper in der Modifikation nach Hirsch-Kauffmann<sup>1)</sup>, Embden<sup>2)</sup>, Meyerhof<sup>3)</sup>.

Prinzip: Die zerkleinerte Muskulatur wird durch Salzsäure und Quecksilberchlorid nach Schenck enteweißt; die in das Schenckfiltrat mit übergehenden störenden Stoffe (Glucose, Lactacidogen, Glykogen) werden durch Kupfersulfat und Calciumhydroxyd entfernt. Die Milchsäure wird in schwefelsaurer Lösung mit Permanganat zu Acetaldehyd oxydiert, das Acetaldehyd überdestilliert, und in einer abgemessenen Kaliumbisulfatlösung aufgenommen, die mit Jodlösung zurücktitriert wird.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 140, S. 25. 1924. Vgl. hierzu Clausen: Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 276. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 143, S. 297. 1925.

<sup>3)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 204, S. 305. 1924.

Erforderliche Lösungen: 5proz. Sublimatlösung,  
 4proz. Kochsalzgesättigte Salzsäure,  
 0,5proz. Schwefelsäure,  
 n/500 Permanganatlösung,  
 n/200 Jodlösung,  
 n/50 Bisulfitlösung.  
 1proz. Stärkelösung.

Das Wasser zur Herstellung der Bisulfitlösung muß aus Jenaer Kolben mit eingeschlifftem Stopfen (ohne Gummiverbindung) über Baryt destilliert werden<sup>1)</sup>. Die Vorratsflasche muß unter sorgfältigem Schutz vor CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S und Alkoholdämpfen, sowie vor Licht aufbewahrt werden. In diesem Falle ist der Titer der kohlenensäure- und metallspurenfreien Sulfitlösung, der gegen Jodlösung mit 1proz. KCl-Stärke (vgl. S. 273) eingestellt wird, für 2—3 Wochen auf 2—3<sup>0</sup>/<sub>0</sub> konstant. Die Lösung soll vor dem Gebrauch erst 2 Tage auf Eis aufbewahrt werden.

10proz. Kupfersulfatlösung.

Kalkmilch, die aus 50 g fein pulverisiertem Calciumoxyd und 200—220 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser hergestellt wird. Das CaO darf keine größere Menge Carbonat enthalten.

Ausführung<sup>2)</sup>: Die Muskeln werden unter Vermeidung jeder unnötigen Verletzung<sup>3)</sup> oder Reizung sorgfältig präpariert, sofort in flüssige Luft geworfen und in einer Porzellanschale mit einem Porzellanpistill in der flüssigen Luft zerkleinert. Während der Zerkleinerung werden die Muskeln in beste Verbandsgaze eingehüllt. Das gewonnene, meist ziemlich grobkörnige Muskelpulver wird in ein Wägegläschen geworfen, das mit dem doppelten des dem Muskelgewicht entsprechenden Volumen 4proz. Kochsalzgesättigter HCl gefüllt ist und dessen Gewicht vor dem Versuch unter Schliffdeckelverschluß festgestellt wird. Vor dem Einbringen des Muskelpulvers wird die Flüssigkeit durch etwas eingegossene flüssige Luft stark gekühlt. Alle Teile der zerkleinerten Muskulatur werden durch vorsichtiges Bewegen des Gefäßes mit der HCl in Berührung gebracht, wobei die Muskulatur allmählich auftaut. Das Gefäß wird sobald als möglich mit seinem Schliffdeckel verschlossen, in den Wägeraum gestellt und, nachdem es dessen Temperatur angenommen hat, gewogen, wodurch die angewandte Muskelmenge ermittelt wird. Dann wird die Enteiweißung nach Schenck durch Zusatz von 20 cm<sup>3</sup> 5proz. Sublimat beendet. Nunmehr

<sup>1)</sup> Vgl. Meyerhof: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 188, S. 117.

<sup>2)</sup> Nach Hirsch-Kauffmann: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 140, S. 43. 1924.

<sup>3)</sup> Vgl. Meyerhof: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 182, S. 239. 1920.

bleibt die Flüssigkeit unter öfterem Umschütteln mindestens 16 Std. stehen, damit völliger Diffusionsausgleich zwischen Niederschlag und Flüssigkeit erfolgt. Alsdann wird durch trockene Filter filtriert und das Hg in einem möglichst großen Teil des Filtrats durch  $H_2S$  gefällt. Nach Abtrennung des Sulfidniederschlages durch Filtration unter Verwendung eines trockenen Filters wird der Schwefelwasserstoff rasch durch einen Luftstrom verjagt und ein genau gemessener, aliquoter Teil des Filtrats (z. B.  $30\text{ cm}^3$ ) in einen Meßkolben von  $50\text{ cm}^3$  pipettiert. Die Flüssigkeit wird mit  $4\text{ cm}^3$  10 proz. Kupfersulfatlösung versetzt und dann unter Verwendung von blauem Lackmuspapier als Indicator mit starker



Abb. 59.

Natronlauge annähernd neutralisiert<sup>1)</sup>, wobei kein Kupferhydroxyd ausfallen soll. Nunmehr werden  $10\text{ cm}^3$  Kalkmilch, die unmittelbar vor dem Gebrauch gründlich durchgeschüttelt wird, hinzugefügt und der Kolben bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Beim Zusatz der Kalkmilch entsteht ein intensiv blauer Niederschlag. Die Reaktion der Flüssigkeit muß jetzt stark alkalisch sein. Nunmehr wird der Inhalt des Meßkolbens in einen Erlenmeyerkolben übergossen und unter häufigem Umschütteln etwa eine halbe Stunde stehen gelassen und dann durch ein trocknes Gefäß filtriert. Von der Kohlehydratfreiheit des Filtrates überzeugt man sich an einer kleinen Probe durch den negativen Ausfall der Reaktion nach Molisch<sup>2)</sup>. Ein möglichst großer, genau gemessener aliquoter Teil des Filtrates — z. B.  $35\text{ cm}^3$  — wird in einen Jenenser Kjeldahlkolben von etwa  $200\text{—}300\text{ cm}^3$  pipettiert, mit wenigen Tropfen 25proz.  $H_2SO_4$  gegen Lackmus neutralisiert und dann noch mit soviel  $H_2SO_4$  versetzt, daß der Schwefelsäuregehalt der Flüssigkeit annähernd  $0,5\%$  beträgt.

Nach Hinzufügen von etwas Talkum wird die Destillation begonnen. Der Kolben ist mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen. Durch die eine Bohrung führt das Permanganatzufuhrrohr. Zum Zweck eines sehr regelmäßigen Tropfenflusses hat das Zuflußrohr die Form einer spitz ausgezogenen Glasschleife<sup>3)</sup> (vgl. Abb. 59). Die Spitze führt durch den Stopfen. Zur Vermeidung des Eindringens von Wasserdampf oder Luft

<sup>1)</sup> Salkowski: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 3, S. 79. 1879. — Van Slyke u. Fitz: Journ. of biol. chem. Bd. 32, S. 455. 1917.

<sup>2)</sup>  $0,5\text{ cm}^3$  der Lösung mit 1—2 Tropfen einer 10 proz. Lösung von reinem  $\alpha$ -Naphthol in reinem Alkohol, durchschütteln und unterschichten mit  $1\text{ cm}^3$  reiner konz.  $H_2SO_4$ . Auftreten eines violetten Ringes bedeutet positiven Ausfall.

<sup>3)</sup> Vgl. Embden: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 143, S. 301. 1925.

in das Rohr trägt das Rohr an der Biegungsstelle einen Sporn aus massivem Glas. Das Glasrohr wird durch eine der Bohrungen des den Kolben verschließenden Gummistopfens gesteckt und ist mittels Gummischlauch mit einem Trichter verbunden, der die ( $\frac{1}{500}n$ ) Permanganatlösung enthält. An diese Hauptleitung ist eine Nebenleitung angeschlossen, die durch T-Verbindung mit der Tropfvorrichtung kommuniziert und oben ebenfalls in einen Trichter mündet, der mit Wasser gefüllt ist. Der Permanganatrichter und der Wassertrichter sind durch Schraubenklemmen verschließbar; in die gemeinsame Leitung ist ein Glashahn mit schlitzförmiger Feineinstellung eingeschaltet. Vor Versuchsbeginn wird von dem Wassertrichter aus die Tropfvorrichtung mit Wasser gefüllt und, nachdem die Flüssigkeit zum Sieden gekommen ist, die Tropfgeschwindigkeit mit Wasser genau eingestellt und dann der Permanganathahn geöffnet und der Wasserhahn geschlossen. Die Tropfgeschwindigkeit wird so gewählt, daß die in dem Jenenser Kjeldahlkolben von 75—100 cm<sup>3</sup> Inhalt befindliche, lebhaft siedende Milchsäurelösung genau das gleiche durch eine Marke bezeichnete Volumen behält. Im übrigen soll die Tropfgeschwindigkeit nur eine sehr geringe, die einzelnen Tropfen möglichst klein sein, derart, daß die Oxydation einer Milchsäuremenge von 3 mg etwa 1 $\frac{1}{2}$  Std. dauert. Trotz dieser langsamen Oxydationsdauer und des lebhaften Siedens gehen infolge der starken Rückflußwirkung des etwa 20—25 cm langen aufsteigenden Teiles des Destillationsrohres (Weite etwa 5 mm) nur ungefähr 100 cm<sup>3</sup> Wasser über. Durch die andere Stopfenbohrung geht ein zweimal rechtwinklig gebogenes Glasrohr. An dem dem Glaskolben zugewendeten Ende sitzt ein Destillationsaufsatz. Das absteigende Rohr ist an einen Schlangenkühler angeschmolzen. Das Lumen des Schlangenkühlers soll tunlichst eng sein. Oberhalb des Schlangenkühlers ist ein rechtwinklig abgebogenes Glasrohr mit eingeschliffenem Glashahn angeschmolzen, durch den hindurch der Kühler nach beendeter Destillation gespült wird<sup>1)</sup>. Der horizontale Schenkel des Destillationsrohres soll nach der Seite des Kühlers zu etwas geneigt sein. Als Vorlage dienen 20 cm<sup>3</sup> n/50 Kaliumbisulfidlösung, die mit etwa dem doppelten Volumen destillierten eisgekühlten Wassers verdünnt sind; die Vorlage wird andauernd von außen mit Eis gekühlt. Es ist notwendig, daß die Milchsäurelösung während der Überführung sich dauernd in lebhaftem Sieden befindet und mit starker Flamme beheizt wird. Um die hierbei drohende Überhitzung der Ränder (ein

<sup>1)</sup> Z. T. nach einer Anordnung, die sich in unserem Laboratorium bewährt hat.



wesentlicher Faktor bei Milchsäureverlusten) zu vermeiden, wird der Destillationskolben von der Flamme durch ein Stück dicker Asbestpappe von etwa 20 cm im Quadrat getrennt. Die Asbestpappe wird in der Mitte angefeuchtet und durch Kneten eine dickwandige Höhlung hergestellt, in die die zu verwendende Kolbengröße genau hineinpaßt, und zwar so, daß der Flüssigkeitsrand bei Verwendung einer Flüssigkeitsmenge von 20 cm<sup>3</sup> den oberen Rand der Höhlung eben überragt.

Titriert wird mit n/100 oder n/200 Jodlösung. 1 cm<sup>3</sup> n/100 Jod entspricht 0,45 mg Milchsäure.

Bestimmung im Blut: 20 cm<sup>3</sup> werden mit 20 cm<sup>3</sup> 4proz. Salzsäure hämolysiert. Nachdem das Blut fast völlig lackfarben geworden ist, wird die Enteiweißung durch Hinzufügung von 2 Volumen 5proz. HgCl<sub>2</sub>-Lösung unter gründlichem Schütteln ausgeführt. Ein möglichst großer Anteil des entquecksilberten, Filtrates wird, genau wie es für die Muskulatur beschrieben, im Meßkolben von 100 cm<sup>3</sup> der Kupfer-Kalkfällung unterworfen und wie oben weiterbehandelt. Hirsch-Kauffmann und Embden<sup>1)</sup> weisen noch darauf hin, daß man bei Bestimmung von Milchsäuremengen zwischen etwa 3,5 und 1,2 mg stets eine Flüssigkeitsmenge von nur 20 cm<sup>3</sup> anwenden soll, da die Aldehydausbeute bei größeren Milchsäurekonzentrationen besser wird.

Die Größe des Bestimmungsfehlers in reinen Milchsäurelösungen mit einem Milchsäuregehalt von 3—4 mg beträgt durchschnittlich etwa 4<sup>0</sup>/<sub>6</sub>. Innerhalb der gleichen Größe liegen die Fehler der Milchsäurebestimmung in der Muskulatur und im Blute, vorausgesetzt, daß mindestens ein 3—4 mg enthaltender Filtratanteil schließlich zur Überführung gelangt. Bei Beobachtung der Vorschriften von Embden übersteigt der Fehler der Bestimmungsmethode nicht 3—4<sup>0</sup>/<sub>6</sub>.

#### Methode nach Warburg<sup>2)</sup> (Glykolyse im lebenden Gewebe).

Prinzip: Die Glykolyse wird gemessen durch eine volumetrische CO<sub>2</sub>-Bestimmung in Barcroftmanometern. CO<sub>2</sub> wird in äquimolekularen Mengen durch die entstehende Milchsäure aus Bicarbonatlösung in Freiheit gesetzt.

Herstellung von Gewebsschnitten: Die Herstellung der Schnitte<sup>3)</sup> geschieht mit einem mit Ringerlösung<sup>4)</sup> befeuchteten

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 143, S. 301. 1925.

<sup>2)</sup> Warburg u. Negelein: Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 317, 1923; Bd. 152, S. 51 u. 311; Negelein: Bd. 158, S. 121. 1925.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 323. 1923.

<sup>4)</sup> „Ringerlösung für Glykolyse“: 100 ccm NaCl, 2 ccm KCl, 2 ccm CaCl<sub>2</sub> und 20 ccm NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (die dem Serum der betreffenden Tier-

Rasiermesser. Das zu schneidende Organ wird auf Filtrierpapier gelegt und an der das Papier berührenden Fläche mit Ringerlösung befeuchtet. Es werden immer eine Reihe von Schnitten hergestellt. Die Schnitte werden in eine Glasschale gelegt, mit der Schere zu rechteckigen Scheiben zurechtgeschnitten und im durchfallenden Licht verglichen. Man kann so leicht die dünnsten und gleichmäßigsten Schnitte erkennen. Durch Unterlegung von Millimeterpapier wird festgestellt, wieviel Millimeterquadrate jeder Schnitt bedeckt und daraus seine Fläche berechnet, die 30—50 mm<sup>2</sup> betragen soll. Die Dicke der Schnitte soll 0,2—0,4 mm betragen. Um das Volumen der Schnitte zu bestimmen, werden sie bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Trockengewicht mit 5 multipliziert, gibt mit hinreichender Genauigkeit das Frischgewicht und das Volumen. Das Verhältnis Volumen: Fläche gibt die (mittlere) Dicke der Schnitte an. Beim Arbeiten mit Tumoren ist darauf zu achten, daß die Schnitte frei von nekrotischen Teilen sind, die durch ihre gelbliche Farbe sich von dem nichtnekrotischen weißen Gewebe abheben.

#### Messung der Glykolyse nach Warburg<sup>1)</sup>.

Die Apparatur (Wasserthermostat, Schüttelvorrichtung, Manometer und der Trog) ist aus Abb. 60 und 61 ersichtlich. Über Ermittlung der Gefäßkonstante (vgl. S. 107). — In zwei Tröge I und II, deren Volumen um nicht mehr als 10% differieren soll, bringt man je einen Gewebsschnitt. In dem Troge I befinden sich 0,5 cm<sup>3</sup> Ringerlösung, in dem Troge II 0,5 cm<sup>3</sup> einer Ringerlösung, der pro Liter 2 g Traubenzucker zugesetzt sind. Die Schnitte sind in einer größeren Menge Lösung vorgebadet, Schnitt I in zuckerfreier Ringerlösung, Schnitt II in zuckerhaltiger. Die Einsätze der Tröge bleiben frei von Kalilauge. Nachdem die Tröge mit dem Barcroftmanometer verbunden sind, werden ihre Gasräume mit einer Mischung von 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> und 95 Vol.-% Sauerstoff (oder 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> und 95 Vol.-%

art isoton sind; arbeitet man z. B. mit Rattenorganen, so sind diese Lösungen also dem Rattenserum isoton zu machen. Rattenserum gefriert bei etwa —0,56°; die isotone Stammbicarbonatlösung ist 0,15 molar, d. h. 1,3 proz.). Sie enthält pro Liter etwa achtmal soviel NaHCO<sub>3</sub> wie die „Ringerlösung für Atmung“. Die Konzentrationen der anderen Salzlösungen für Menschen- und Rattenserum sind: NaCl 9 promill., KCl 11,5 promill., CaCl<sub>2</sub> (wasserfrei) 12,2 promill. Vgl. Okamoto: Biochem. Zeitschr. Bd. 160, S. 54. 1925.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 330. 1923.

Luft oder 5 Vol.-%  $\text{CO}_2$  und 95 Vol.-% N) gefüllt und Gewebsschnitte und Lösungen durch Schütteln mit dieser Gasmischung

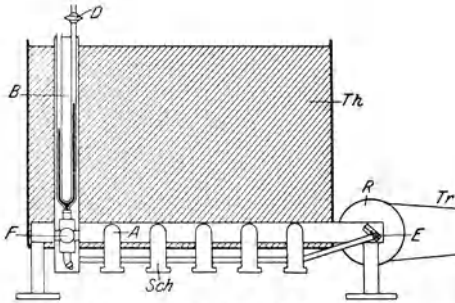


Abb. 60. *Th* Wasserthermostat, *B* Barocroftmanometer, *Sch* Schüttelvorrichtung, *R* Triebrolle, *Tr* Treibriemen.

auf die Milchsäurebildung aus dem Traubenzucker der Ringerlösung zurückzuführen.

Die Kohlensäuremenge, die durch Glykolyse ausgetrieben wird bei Druckänderungen  $H_I$  bzw.  $H_{II}$  und den Gewebsschnitten vom Gewicht  $m_1$  bzw.  $m_2$  ist in  $\text{mm}^3$  gleich

$$x_{\text{CO}_2} = \left( H_{II} - H_I \frac{m_2}{m_1} \right) K_{\text{CO}_2}^{II}$$

wo  $K_{\text{CO}_2}^{II}$  die Gefäßkonstante für  $\text{CO}_2$  des Troges II bedeutet. 1  $\text{mm}^3$  Kohlensäure ist 0,004 mg Milchsäure äquivalent. Die Größe der Glykolyse wird ausgedrückt durch den Quotienten

$$\frac{\text{mg gebildete Milchsäure}}{\text{mg Gewebe} \cdot \text{Stunden}}$$

Als Gewicht des Gewebes wird das Trockengewicht gesetzt, das nach völligem Trocknen bei  $100^\circ$  resultiert.

#### a) Glykolyse unter anaeroben Bedingungen<sup>1)</sup>.

Sie ist einfacher zu berechnen, da die gesamte in Freiheit gesetzte Kohlensäure nur durch die Milchsäure aus dem Bicar-

Abb. 61. Atmungstrog, der durch den Helmschliff *H* mit dem Barocroftmanometer verbunden wird. *G* ist ein massiver Glasgriff, der zum Eindrehen des Troges in den Helmschliff dient. *N* ist eine feine, auf den Boden des Troges aufgeschmolzene Glasnadel, die den Gewebsschnitt *G* faßt. *E* ist ein Einsatz.

<sup>1)</sup> Warburg, O.: Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 316, 1923; Minami, S.; Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 334. 1923.

bonat ausgetrieben ist und nicht ein Teil Atmungs-Kohlensäure ist. Ihre Messung geschieht nach der Gleichung

$$x_{CO_2} = h_{CO_2} \cdot k_{CO_2},$$

wo  $h_{CO_2}$  gleich der beobachteten Druckänderung  $h$  ist und  $K_{CO_2}$  die Gefäßkonstante bei 5%  $CO_2$  und 95% N (S. 112) darstellt. Als Maß für die Größe der Spaltung bezogen auf die Zeit und die Menge der Substanz (mg) gilt die Gleichung

$$Q_{CO_2}^{N_2} = \frac{\text{mm}^3 \text{ Extrakohlensäure gebildet in Stickstoff}}{\text{mg Gewebe} \times \text{Stunden}}$$

(Extrakohlensäure in Stickstoff), wobei  $m$  die Anzahl mg Gewebe als Trockensubstanz ist. Mit 0,004 multipliziert erhält man den Quotienten

$$\frac{\text{mg Milchsäure}}{\text{mg Gewebe} \times \text{Stunden}}.$$

Um vollständige Anoxybiose zu erhalten (gewöhnliche Verunreinigung des  $CO_2$ - $N_2$ -Gemisches etwa 0,75% Sauerstoff), wird das Gas auf dem Wege von der Bombe zur Ringerlösung durch ein glühendes mit metallischem Kupfer gefülltes Rohr geleitet. Immer ist diese Reinigung erforderlich, wenn man mit isolierten Zellen arbeitet, denn hier genügt 1 Vol.-%  $O_2$  zur Versorgung der Zellen mit dem zur Atmung notwendigen Sauerstoff.

#### b) Glykolyse unter aeroben Bedingungen<sup>1)</sup>.

Hier ist die manometrische Messung komplizierter. Der entstehende Gasdruck ist abhängig von der entstehenden Atmungskohlensäure, dem Atmungssauerstoff, der verschwindet, und der Extrakohlensäure, der aus dem Bicarbonat durch die Milchsäure ausgetriebenen  $CO_2$ . Es bezeichnet  $x_{O_2}$  die Druckänderung durch Sauerstoff (in  $\text{mm}^3 = h_{O_2} \cdot K_{O_2}$ ),  $x_{CO_2}$  die Druckänderung durch  $CO_2$  (in  $\text{mm}^3 = h_{CO_2} \cdot K_{CO_2}$ ) und  $\gamma$  das Verhältnis

$$\frac{x_{CO_2}}{x_{O_2}} \text{ und} \\ h = h_{O_2} + h_{CO_2}.$$

So bestehen nach Auflösen nach  $x_{O_2}$  und  $x_{CO_2}$  die Gleichungen:

$$x_{O_2} \text{ (der veratmete Sauerstoff)} = h \left[ \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k_{CO_2} + \gamma k_{O_2}} \right], \quad 1)$$

$$x_{CO_2} \text{ (die gesamte in Freiheit gesetzte Kohlensäure)} = h \left[ \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{\gamma + k_{O_2}} \right]. \quad 2)$$

<sup>1)</sup> Warburg, O.: Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 53 (1924).

Zur Bestimmung von  $\gamma$  werden zwei verschiedene Messungen ausgeführt, wobei das zweite Mal unter sonst gleichen Bedingungen nur unter Änderung des Volumens der Ringerlösung ( $v_F$ ), gearbeitet wird. Indem wir die veränderten Größen der 2. Gleichung mit großen Buchstaben ( $K$ ) bezeichnen und  $h$  und  $H$  die in gleichen Zeiten beobachteten Druckänderungen bedeuten, bekommen wir für  $\gamma$  den Ausdruck:

$$\gamma = \frac{K_{CO_2} \cdot k_{CO_2}}{K_{O_2} \cdot k_{O_2}} \cdot \frac{H K_{O_2} - h k_{O_2}}{h k_{CO_2} - H K_{CO_2}}. \quad 3)$$

Mit Hilfe dieser 3 Gleichungen kann die Aufgabe, Atmung und Glykose in Gegenwart von Sauerstoff zu messen, gelöst werden.

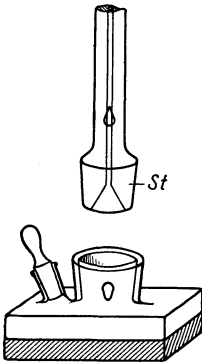


Abb. 62.

Man benutzt 3 Gefäße (Abb. 62) von ungefähr gleichem Inhalt  $A$ ,  $B$  und  $C$ . Ihr Rauminhalt einschließlich Manometercapillare bis zum Meniscus der Sperrflüssigkeit beträgt 12—13 cm<sup>3</sup>. Der Stopfen  $St$  ist bis zum Beginn der Manometercapillare mit festem hochschmelzendem Paraffin überzogen. Die Gefäße  $A$  und  $B$  dienen zur Bestimmung von  $\gamma$ ,  $x_{CO_2}^0$  und  $x_{O_2}$ . In Gefäß  $A$  kommen 3 cm<sup>3</sup>, in Gefäß  $B$  8 cm<sup>3</sup> Ringerlösung; es wird mit einem Gemisch von 5 Vol.-% Kohlensäure in Sauerstoff gesättigt. In jedes der beiden Gefäße kommt ein Gewebsschnitt, am besten zwei möglichst gleiche Hälften ein und desselben Schnittes. Die Luft wird durch die obige Gas Mischung verdrängt und die Druckänderungen, die in den beiden Gefäßen in gleichen Zeiten auftreten, gemessen. Ist dies geschehen, so werden die Schnitte aus den beiden Gefäßen herausgenommen, kurz mit destilliertem Wasser abgespült, bei 100° zur Konstanz getrocknet und in der Mikrowave gewogen.

Hat  $a$  mg Gewebe in Gefäß  $A$  die Druckänderung  $h$  hervorgebracht und  $b$  mg Gewebe in Gefäß  $B$  die Druckänderung  $H'$ , so berechnet sich  $H$  nach der Gleichung  $H = H' \cdot \frac{a}{b}$ .  $H$  und  $h$ , (die in gleichen Zeiten durch gleiche Schnittgewichte hervorbrachten Druckänderungen), werden in Gleichung (3) eingesetzt. So erhält man  $\gamma$  und durch Einsetzen von  $\gamma$  in (1) und (2)  $x_{CO_2}$  und  $x_{O_2}$ .

Gefäß  $C$  dient als Thermobarometer. Es wird mit einigen cm<sup>3</sup> Ringerlösung und dem Gasgemisch 5 Vol. CO<sub>2</sub> % in N<sub>2</sub> oder O<sub>2</sub> gefüllt.

Zur vergleichenden Messung dienen die Quotienten:

$$Q_{O_2} = \frac{\text{mm}^3 \text{ verbrauchten Sauerstoffs}}{\text{mg Gewebe} \times \text{Stunden}} \text{ (Atmung),}$$

$$Q_{CO_2}^{O_2} = \frac{\text{mm}^3 \text{ Extrakohlensäure, gebildet in } O_2}{\text{mg Gewebe} \times \text{Stunden}}.$$

(Glykolyse unter aeroben Bedingungen), wobei „Extrakohlensäure“ =  $x_{CO_2} + x_{O_2}$ , indem angenommen wird, daß bei Gegenwart von Traubenzucker die Atmungskohlensäure =  $-x_{O_2}$ .

In einer neuen Ableitung zeigt Warburg einen einfachen Weg zur Bestimmung von  $x_{CO_2}$  und  $x_{O_2}$  (der unbekanntem Volumina der entstandenen resp. verschwundenen Gasmengen), ohne die Einführung von  $\gamma$ . An der Methodik ändert sich dabei nichts.

Die Bezeichnungen (die mit großen Buchstaben gelten für das Atmungsgefäß mit dem großen Volumen Ringerlösung, die mit kleinen Buchstaben für das Atmungsgefäß mit dem kleinen Volumen Ringerlösung) sind die folgenden:

$H$  = beobachtete Druckänderung,

$H_{CO_2}$  = Druckänderung für  $CO_2$ ,

$H_{O_2}$  = „ „ „  $O_2$ ,

$K_{CO_2}$  = Gefäßkonstante für  $CO_2$ ,

$K_{O_2}$  = „ „ „  $O_2$ .

Die beobachtete Druckänderung  $H$  setzt sich aus den Druckänderungen für  $CO_2$  und  $O_2$  zusammen.

$$H = H_{CO_2} + H_{O_2} \quad \dots 1) \quad h = h_{CO_2} + h_{O_2} \quad \dots 1a)$$

ferner folgen aus

$$x_{CO_2} = H_{CO_2} \cdot K_{CO_2}$$

$$x_{CO_2} = h_{CO_2} \cdot k_{CO_2}$$

$$x_{O_2} = H_{O_2} \cdot K_{O_2}$$

$$x_{O_2} = h_{O_2} \cdot k_{O_2}$$

$$H_{CO_2} = \frac{x_{CO_2}}{K_{CO_2}} \quad \dots 2)$$

$$h_{CO_2} = \frac{x_{CO_2}}{k_{CO_2}} \quad \dots 2a)$$

$$H_{O_2} = \frac{x_{O_2}}{K_{O_2}} \quad \dots 3)$$

$$h_{O_2} = \frac{x_{O_2}}{k_{O_2}} \quad \dots 3a)$$

aus 1), 2), 3) folgt

aus 1a), 2a), 3a) folgt

$$H = \frac{x_{CO_2}}{K_{CO_2}} + \frac{x_{O_2}}{K_{O_2}}$$

$$h = \frac{x_{CO_2}}{k_{CO_2}} + \frac{x_{O_2}}{k_{O_2}}$$

$$x_{CO_2} = K_{CO_2} \left( H - \frac{x_{O_2}}{K_{O_2}} \right) \quad \dots 4)$$

$$x_{CO_2} = k_{CO_2} \left( h - \frac{x_{O_2}}{k_{O_2}} \right) \quad \dots 4a)$$

aus 4 und 4a) folgt:

$$x_{O_2} = \frac{K_{O_2} \cdot k_{O_2} (K_{CO_2} \cdot H - k_{CO_2} \cdot h)}{K_{CO_2} \cdot k_{O_2} - K_{O_2} \cdot k_{CO_2}}$$

Durch analoge Ableitung folgt:

$$x_{CO_2} = \frac{K_{CO_2} \cdot k_{CO_2} (h k_{O_2} - H K_{O_2})}{K_{CO_2} \cdot k_{O_2} - K_{O_2} \cdot k_{CO_2}}$$

## Wirkung der Blausäure auf Glykolyse.

Die Glykolyse ist gegenüber Blausäure wenig empfindlich. n/1000-Blausäure wirkt unter anaeroben Bedingungen nicht auf die Glykolyse, während dieselbe Konzentration die Atmung der Carcinomzelle fast vollständig hemmt. Die aerobe Glykolyse ist also in Blausäure ebenso groß wie die anaerobe.

Beispiel <sup>1)</sup>): Rattencarcinom in Blausäure.

37,5<sup>0</sup> Ringerlösung · C<sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> = 2,5 · 10<sup>-2</sup>, 0,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Glucose, 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> CO<sub>2</sub>, p<sub>h</sub> = 7,66.

V<sub>f</sub> = Volumen der Ringerlösung, V<sub>g</sub> = Volumen des Gasraumes bis zum Meniscus der Sperrflüssigkeit.

	Gefäß B	Gefäß A	Gefäß C
	10 <sup>-3</sup> n-HCN	10 <sup>-3</sup> n-HCN	5 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> CO <sub>2</sub> in N <sub>2</sub>
Volumina in cm <sup>3</sup>	5 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> CO <sub>2</sub> in O <sub>2</sub> V <sub>f</sub> = 8,00 V <sub>g</sub> = 5,02	5 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> CO <sub>2</sub> in O <sub>2</sub> V <sub>f</sub> = 3,00 V <sub>g</sub> = 9,0	V <sub>f</sub> = 3,0, V <sub>g</sub> = 10,7
Gefäßkonstanten in qmm . . . . .	K <sub>O<sub>2</sub></sub> = 0,46 K <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 0,89	k <sub>O<sub>2</sub></sub> = 0,8 k <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 0,96	k <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 1,11
Schnittgewichte Druckkändg. i. 15 Min.	7,10 mg H = + 69,5 mm Q <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>O<sub>2</sub></sup> = + 36	6,4 mg h = + 60,0 mm Q <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>O<sub>2</sub></sup> = + 35	6,82 mg h <sub>CO<sub>2</sub></sub> = + 52,5 mm Q <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>N<sub>2</sub></sup> = + 34

Beispiel (aerobe und anaerobe Glykose)<sup>2)</sup>

Rattencarc. Q<sub>O<sub>2</sub></sub>, Q<sub>CO<sub>2</sub></sub><sup>O<sub>2</sub></sup> und Q<sub>CO<sub>2</sub></sub><sup>N<sub>2</sub></sup>  
37,5<sup>0</sup>, Ringerlösung, C<sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> = 2,5—10<sup>-2</sup>,  
0,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Glucose, 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> CO<sub>2</sub> (p<sub>h</sub> = 7,66).

Gasraum	5 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> CO <sub>2</sub> in O <sub>2</sub>		5 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> CO <sub>2</sub> i. N <sub>2</sub>
	Gefäß A	Gefäß B	Gefäß C
Volumina in cm <sup>3</sup>	V <sub>f</sub> = 3 V <sub>g</sub> = 10,54	V <sub>f</sub> = 8 V <sub>g</sub> = 5,07	V <sub>f</sub> = 3, V <sub>g</sub> = 9,28
Gefäßkonstanten in qmm	k <sub>O<sub>2</sub></sub> = 0,93 k <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 1,09	K <sub>O<sub>2</sub></sub> = 0,47 K <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 0,89	k <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 0,89
Schnittgewichte Beobachtete Druckkändg. in 15 Min.	3,01 mg h = + 15 mm h = + 15 mm h = + 16 mm	3,32 mg H = + 15,5 mm H = + 14,0 mm H = + 14,5 mm	2,35 mg h <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 17,5 mm h <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 18,0 mm h <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 17,5 mm
	γ = - 3,65 Q <sub>O<sub>2</sub></sub> = - 8,9 Q <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>O<sub>2</sub></sup> = + 23,7		Q <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>N<sub>2</sub></sup> = + 27,3

<sup>1)</sup> Warburg, O., K. Posener u. E. Negelein: Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 338, Protokoll 8.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 338, Protokoll 7.

Schnittgewichte	1,86 mg	1,71 mg	1,81 mg
Beobachtete	$h = + 10,5 \text{ mm}$	$H = + 12,0 \text{ mm}$	$h_{CO_2} = + 16,0 \text{ mm}$
Druckändg. in 15 Min.	$h = + 10,0 \text{ mm}$	$H = + 9,0 \text{ mm}$	$h_{CO_2} = + 15,0 \text{ mm}$
desgl.	$h = + 11,5 \text{ mm}$	$H = + 11,0 \text{ mm}$	$h_{CO_2} = + 16,0 \text{ mm}$
desgl.	$\gamma = - 7,36$		$Q_{CO_2}^{N_2} = + 33,8$
	$Q_{O_2} = - 4,05$		
	$Q_{CO_2}^{O_2} = + 25,7$		

Um in ein und derselben Blutprobe die Glykolyse und die Atmung zu messen, verfuhr E. Negelein<sup>1)</sup> wie folgt. Defibriertes Blut wurde mit 5% CO<sub>2</sub> in Sauerstoff gesättigt und zu einem Teil so viel Blausäure hinzugefügt, daß ihre Konzentration  $\frac{1}{1000}$  n war. (Da kleine Konzentrationen an Blausäure die Atmung, nicht aber die Glykolyse hemmen, so sind in blausäurehaltigem, mit Sauerstoff gesättigtem Blute die Bedingungen der Anaerobiose gegeben.) Die Atmung wurde dann nach Warburg<sup>2)</sup> aus der Druckabnahme am Manometer im Barcroft-Apparat, der Zuckerverbrauch nach Hagedorn-Jensen bestimmt. Für jede Einzelmessung genügte 1 cm<sup>3</sup> Blut, im ganzen also 6 cm<sup>3</sup> (Sauerstoffbindung ohne Blausäure, Zuckergehalt vorher und nachher ohne Blausäure und mit Bläusäure). Zur Zuckerbestimmung wurde 1 cm<sup>3</sup> Blut vor der Enteiweißung mit 4 ccm Wasser lackfarben gemacht. Um den Sauerstoff- und Zuckerverbrauch auf die Gewichtseinheit trockener Zellsubstanz reduzieren zu können, wurde das Zellvolumen in 1 cm<sup>3</sup> Blut im Hämatokriten ermittelt und das Sedimentvolumen durch 5 dividiert. Die aerobe Glykolyse ergab sich dann aus dem Zuckerverbrauch, der Versuchszeit und der Zellmenge. Bei der aeroben Glykolyse mußte man den Zuckerverbrauch in der Atmung berücksichtigen. Dies geschah so, daß man den Sauerstoffverbrauch auf Zuckerverbrennung umrechnete (1 Mol Sauerstoff =  $\frac{1}{6}$  Mol Zucker). Der so berechnete Zuckerverbrauch wurde mit dem nach Hagedorn-Jensen gefundenen verglichen. War der aerob gefundene Zuckerverbrauch ebenso groß oder kleiner als der aus der Atmung berechnete, so wurde die aerobe Glykolyse gleich Null gesetzt (normales bzw. anämisches Gänseblut), war er größer (wie im Kaninchenblut), so ist eine aerobe Glykolyse vorhanden.

Schüttelt man glykolysierende Gewebe im Serum statt in Ringerlösung, so setzt sich die entstehende Milchsäure zum Teil

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 158, S. 131. 1925.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 69, S. 457. 1910.



mit dem Bicarbonat des Serums, zum Teil mit dem Alkaliproteinat um unter Bildung freier Proteine. Es erscheint also nicht eine der Milchsäure äquivalente Menge an freier Kohlensäure sondern weniger. Man muß also vorher die Verteilung der Milchsäure zwischen Alkalibicarbonat und Alkaliproteinat ermitteln. Dies geschieht, indem man genau unter den Bedingungen des Glykolyseversuchs in das Versuchsserum eine bekannte Menge Milchsäure einträgt und den Druck der entwickelten Kohlensäure mißt. Dabei müssen die eingetragenen Milchsäuremengen so bemessen werden, daß etwa ebensoviel Kohlensäure erscheint wie bei dem Versuch mit dem Gewebe.

Eine derartige Messung gestaltet sich nach Negelein<sup>1)</sup> folgendermaßen: In ein Gefäß von der Form Abb. 48, S. 108 bringt man 1 cm<sup>3</sup> Serum und einen Gewebsschnitt, füllt den Gasraum mit 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Kohlensäure in Stickstoff, schüttelt so schnell, daß Gas und Flüssigkeitsphase zu jeder Zeit praktisch im Absorptionsgleichgewicht sind. In der Zeit  $t$  betrage die Druckzunahme infolge der CO<sub>2</sub>-Entwicklung  $H$  mm. Nunmehr bereitet man zwei Gefäße der gleichen Form und Abmessungen vor, gibt in den Hauptraum  $R$  je 1 cm<sup>3</sup> desselben Serums, in den Anhang  $A$  verschiedene Mengen Milchsäure [z. B. etwa  $1-0,5 \cdot 10^{-5}$  Mol pro cm<sup>3</sup>], sättigt mit 5 proz. CO<sub>2</sub> in Stickstoff, kippt, nachdem Druck und Temperatur ausgeglichen sind, die Milchsäure aus  $A$  in  $R$  ein und spült den Anhang  $A$  mehrmals durch Neigen des Gefäßes mit dem Serum aus; die Zunahme des CO<sub>2</sub>-Drucks betrage in dem einen Gefäß  $h_1$ , in dem anderen  $h_2$ , im allgemeinen  $h$ , während sie beim Eintragen der Milchsäure in Ringerlösung  $h_0$  beträgt. Multipliziert man das Mittel der  $h_0/h$ -Werte (die für kleine Milchsäuremengen fast unabhängig von der Menge der eingetragenen Milchsäure ist) mit  $H$ , der vom Gewebe hervorgebrachten Zunahme des CO<sub>2</sub>-Drucks, so erhält man die Kohlensäure, die der entwickelten Milchsäure äquivalent ist nach der Gleichung

$$x_{CO_2} = \frac{h_0}{h} \cdot H \cdot K_{CO_2},$$

worin also  $h_0/h$  den Faktor bedeutet, durch

den die Säurebindung des Alkaliproteinats eliminiert wird. — Der Wert dieses Faktors hängt von dem Eiweiß- und Bicarbonatgehalt und von dem  $p_h$  der Seren ab und muß für jeden Fall besonders ermittelt werden.

Bei der anaeroben Glykolyse eines Gewebsschnittes im Serum kann die durch die Milchsäure ausgetriebene Kohlensäure durch Bicarbonatbestimmungen ermittelt werden. Dabei wird die Ab-

<sup>1)</sup> Negelein: Biochem. Zeitschr. Bd. 158, S. 127. 1925.

nahme des Bicarbonats in der Ringerlösung mit den erscheinenden Gasmengen verglichen. Zu diesem Zwecke werden 4 Gefäße, 0, 1, 2, 3 verwandt, wovon Gefäß 0 in  $R$  mit  $1 \text{ cm}^3$  Ringerlösung beschickt als Thermobarometer diene. Gefäß 1 wurde in  $R$  mit  $1 \text{ cm}^3$  Ringerlösung beschickt, in  $A$  mit  $0,2 \text{ cm}^3$  4 proz. Citronensäure, Gefäß 2, wurde in  $R$  mit  $1 \text{ cm}^3$  Ringerlösung beschickt und außerdem einem Gewebsschnitt, in  $A$  mit  $0,2 \text{ cm}^3$  4 proz. Citronensäure, Gefäß 3 wurde wie Gefäß 2 beschickt. Die so vorbereiteten Gefäße wurden mit  $5\% \text{ CO}_2$  in Stickstoff gefüllt und im Thermostaten bei  $37,5^\circ$  10 Min. zwecks Temperatur- und Druckausgleich geschüttelt. Die Zeit, zu der der Ausgleich beendet war, ist gleich  $t^0$ . — Bei  $t^0$  wurde die Citronensäure aus dem Anhänger  $A$  der Gefäße 1 und 2 in den Raum  $R$  eingekippt, wobei die  $\text{CO}_2$ -Mengen ( $\text{mm}^3$ )  $B_1$  und  $B_2$  im Gasraum erscheinen und manometrisch gemessen werden. Gefäß 3 wird eine passende Zeit, etwa 1 Std., weitergeschüttelt, bis zur Zeit  $t$ , wobei der Druck  $H$  gemessen wird. Nach Ablesen von  $H$  wird die Citronensäure aus dem Anhang  $A$  des Gefäßes 3 in den Raum eingekippt, wobei die Kohlensäuremenge  $B_3$  erscheint.

Es besteht die Beziehung  $B_3^0 = B_1 - \frac{m_3}{m_2} (B_1 - B_2)^1$ , wo  $m_2$  und  $m_3$  die Trocken-Gewebsschnittgewichte in mg im Gefäß 2 bzw. 3 sind,  $B_3^0$  die chemisch gebundene  $\text{CO}_2$  in Gefäß 3 zur Zeit  $t^0$  ist. Ist  $B_3^0 - B_3$  während der Zeit  $t^1 - t^0$  gebildete  $\text{CO}_2$ , so ist bei der aeroben Glykolyse in Serum die entwickelte Milchsäuremenge nicht äquivalent der  $\text{CO}_2$ -Menge  $x_{\text{CO}_2} = B_3^0 - B_3$ , sondern der größeren  $\text{CO}_2$ -Menge  $x_{\text{CO}_2} = \frac{h_0}{h} (B_3^0 - B_3)$ .

Nach dieser Anordnung wird die Glykolyse durch drei Bicarbonatbestimmungen gemessen. Diese Anordnung empfiehlt sich auch bei der Messung der aeroben Glykolyse, besonders wenn die Atmung gegenüber der Glykolyse in Betracht kommt, mit dem Unterschiede, daß man im Gasraum  $5\%$  Kohlensäure in Sauerstoff einfüllt. Man berücksichtigt dann den beim Schütteln erscheinenden Druck  $H$  nicht, sondern übersättigt zu den Zeiten  $t^0$  und  $t'$  mit Citronensäure und mißt die entwickelte Kohlensäure. Die Differenz, korrigiert für gleiche Schnittgewichte, ergibt die durch Milchsäure ausgetriebene Kohlensäure:  $x_{\text{CO}_2} = B_3^0 - B_3$ .

Ausführlicher behandelt Warburg die manometrische Mes-

<sup>1)</sup>  $B_1 - B_2$  ist gleich dem Bicarbonatverbrauch vom  $m_2$  während der Ausgleichzeit minus der in  $m_2$  chemisch gebundenen Kohlensäure  $\cdot \frac{m_3}{m_2}$  ( $B_1 - B_2$ ) dasselbe, umgerechnet auf das Gewicht  $m_3$ .

sung des Zellstoffwechsels im Serum in einer späteren Arbeit<sup>1)</sup>. Zur Klärung der Frage, welche Größe dieser Bindung der freiwerdenden CO<sub>2</sub> durch Eiweiß, Phosphate usw. im Serum zukommt, bespricht Verf. zunächst sehr ausführlich ein „Serummodell“. Alle Größen, die im folgenden eine Konzentration ausdrücken, werden definiert als Kubikmillimeter in Kubikzentimeter Lösungsmittel, wobei auch nicht gasförmige Stoffe, wie Bicarbonat, Milchsäure u. ä. als Säureäquivalentwasserstoff ausgedrückt werden: 1 Milligrammatom Säurewasserstoff = 22400 cmm. Eine Reihe von Größen (bei 38°) wird dann weiter definiert, die zum besseren Verständnis an einem Säugetierserum exemplifiziert werden, das mit einer 5proz. CO<sub>2</sub> im Gleichgewicht steht.

$$\beta = 0,054 = \text{Löslichkeit der CO}_2$$

$$= \frac{\text{cmm CO}_2}{\text{ccm Lösungsmittel} \times \text{Normaldruck}}$$

$$p = 470 = \text{CO}_2\text{-Druck in mm Brodie}$$

$$B = 460 = \text{Konzentration des Bicarbonats (cmm/ccm)}$$

$$p \times \beta = 25,4 = \text{Konzentration der freien CO}_2 \text{ (cmm/ccm)}$$

$$c = 485 = \text{Gesamtkonzentration an Kohlensäure } (p \cdot \beta + B)$$

$$[\text{H}^+] = 4 \cdot 10^{-8} = \text{Wasserstoffionenkonzentration } \left( = k \cdot \frac{p \cdot \beta}{B} \right), \text{ wobei}$$

$$(p_H = 7,4) \quad k = 7,2 \cdot 10^{-7} (p_k = 6,14)$$

$$\rho = 0,0524 = \text{Dissoziationsrest der Kohlensäure } \left( \frac{p \beta}{p \beta + B} \right).$$

Bildet sich im Serum CO<sub>2</sub> oder Milchsäure, so wird ein Teil davon als Bicarbonat oder Lactat gebunden, entgeht also der gasvolumetrischen Messung, da für jedes undissoziierte Säuremolekül (SH) ein Molekül CO<sub>2</sub> „retiniert“ wird. Die Zunahme dieser retinierten Säure pro Kubikzentimeter Serum bezeichnet Warburg als die Retention  $\Delta u = (\text{SH})/\text{ccm Serum}$  und untersucht weiterhin die Abhängigkeit dieser Größe vom Druck  $p$  (ausgedrückt in Millimeter Brodie), also den Quotienten  $du/dp$ , der im Falle der CO<sub>2</sub> identisch ist mit dem Quotienten  $dB/dp$ . Es ergeben sich dabei Kurven, deren Verlauf leicht gekrümmt ist; bei 5% CO<sub>2</sub> ist der Quotient 0,1, d. h. 1 ccm Serum retiniert bei 1 mm Druckzunahme 0,1 cmm CO<sub>2</sub>. Daraus ergeben sich ohne weiteres die neuen Gefäßkonstanten nach Art der früheren. Es ist nämlich

$$x_{c_{CO_2}} = h_{c_{CO_2}} \cdot \left[ k_{c_{CO_2}} + v_F \left( \frac{du}{dp} \right)_c \right] = h_{c_{CO_2}} \cdot k_{c_{CO_2}}^{\text{Serum}}, \text{ wobei } du \text{ die Retention}$$

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 164, S. 481. 1925.

der  $\text{CO}_2$  im Serum und  $k_{\text{CO}_2}^{\text{Serum}}$  die neue Gefäßkonstante darstellt.

Analog bei Milchsäure  $x_{\text{CO}_2} = h_{\text{CO}_2} \cdot \left[ k_{\text{CO}_2} + v_F \left( \frac{du}{dp} \right)_M \right] = h_{\text{CO}_2} \cdot k_M^{\text{Serum}}$ .

Die weiteren Untersuchungen betreffen das Serummodell, d. h. eine Ringerlösung, die ein Dipeptid in gleicher Konzentration  $c'$  enthält wie die Gesamtkohlensäure ( $c$ ). Die Retention dieses Modells für  $\text{CO}_2$  ist bei physiologischer Salz- und Wasserstoffionenkonzentration die gleiche wie im Serum, wobei gezeigt wird, daß die Menge der dissoziierten  $\text{CO}_2$  mit dem Dissoziationsrest des Dipeptids und seiner Konzentration in Beziehung steht. Die Konzentration des undissoziierten Dipeptids ist nämlich gemäß Definition des Dissoziationsrestes  $u = \varrho' \cdot c'$ , die Änderung  $\Delta u = \Delta \varrho' \cdot c'$  ( $\varrho' =$  Dissoziationsrest des Dipeptids). Die für Berechnung der Gefäßkonstanten weiterhin nötigen Größen  $(dp)_c$  und  $(dp)_M$  werden berechnet aus dem Dissoziationsrest  $\varrho$  der Kohlensäure und deren Konzentration  $c$ . Es bestehen nämlich die Beziehungen:  $\beta \cdot \Delta p = (\varrho_0 + \Delta \varrho_0)(c_0 + \Delta c_0) - \varrho_0 c_0$ ,  $\beta \cdot \Delta p = c_0 \Delta \varrho_0 + \varrho_0 \Delta c + \Delta \varrho \Delta c$ , wobei  $c_0$  und  $\varrho_0$  die Anfangskonzentration und den anfänglichen Dissoziationsrest bezeichnen,  $\Delta c_0$  und  $\Delta \varrho_0$  die Änderung pro  $\Delta p$ . Für  $(\Delta p)_c$  ergibt sich hierbei

$$(\Delta p)_c = \frac{\Delta u (\varrho_0 + \Delta \varrho) + c_0 \Delta \varrho}{\beta (1 - \varrho_0 - \Delta \varrho)} \text{ und für}$$

$$(\Delta p)_M = \frac{c_0 \Delta \varrho}{\beta (1 - \varrho_0 - \Delta \varrho) + \frac{k_{\text{CO}_2}}{v_F} (\varrho_0 + \Delta \varrho)}$$

In der Praxis kann  $\varrho_0$  berechnet werden, da die Konzentration der freien und der gebundenen Kohlensäure bekannt ist:  $\frac{p\beta}{p\beta + B}$ ,

damit ist auch  $\text{H}^+$  für das Serum bestimmt. Bei einer Veränderung dieser Größe ändert sich auch  $\varrho$ , und es ist aus der Differenz  $\Delta \varrho$ , ferner  $\Delta \varrho'$ ,  $du$  und  $(dp)_M$  leicht zu berechnen: Das neue  $\varrho$  ist

$\frac{\text{H}^+}{\text{H}^+ + K_1}$ , da bei physiologischer  $\text{H}^+$  die Konstante  $K_2$  vernachlässigt werden kann,  $\varrho'$  ist  $\frac{\text{H}^+}{\text{H}^+ + K_3}$ , da  $K_B$  ebenfalls vernachlässigt werden kann.

Die nebenstehende Tabelle ist nach diesem Modus berechnet worden für  $38^\circ$  und die Salzkonzentration einer Ringerlösung.

$\text{H}^+$	Kohlensäure $K_1 = 7,2 \cdot 10^{-7}$	Dipeptid von $K_3 = 4 \cdot 10^{-8}$
$4,0 \cdot 10^{-8}$	0,05263	0,5000
4,1	0,05388	0,5062
4,2	0,05512	0,5122
4,3	0,05636	0,5181
4,4	0,05759	0,5238
4,5	0,05882	0,5294

Ist z. B. bei dem Serummodell  $c = 485$ ,  $c' = 500$  (in cmm/cem),  $\varrho_0 = 0,0526$ ,  $H^+ = 4 \cdot 10^{-8}$ ,  $v_F = 8$  und  $k_{CO_2} = 0,907$  und steigt der Dissoziationsrest der Kohlensäure durch Zugabe von Säure bis  $\Delta\varrho = 0,00373$ , dann ist  $H^+$  auf  $4,3 \cdot 10^{-8}$  gestiegen,  $\varrho'$  um 0,0181. Daraus folgt nach den bisher abgeleiteten Gleichungen

$$\Delta u = 9,05 \text{ mm}^3, (\Delta p)_c = 45,5 \text{ mm}, (\Delta p)_M = 31,6 \text{ mm}, \left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_c = 0,20$$

für  $\Delta p$  ca 46,  $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,29$  für  $\Delta p$  ca 32.

Im natürlichen Serum kann das zu einem bestimmten Wert  $\Delta\varrho$  der Kohlensäure gehörige  $\Delta u$  nicht berechnet werden. Zu seiner experimentellen Bestimmung sollen hier zwei Verfahren mitgeteilt werden.

Im Hauptgefäß befindet sich Serum, in der Birne Milchsäure, gelöst in 0,9proz. NaCl-Lösung. Die Menge der Milchsäure ist klein im Vergleich zum Bicarbonatgehalt des Serums, der Prozentgehalt  $CO_2$  des Gasraumes ist bekannt. Sobald Absorptionsgleichgewicht eingetreten ist, wird die Birne mit dem Serum mehrfach ausgespült und der positive Druck  $h$ , der auftritt, beobachtet. In einem Parallelversuch befindet sich in der Birne nur NaCl-Lösung; hier tritt infolge der Verdünnung eine leichte Druckabnahme auf, die zu der Druckzunahme des Versuchs hinzugezählt werden muß.  $H$  sei dann die Gesamtdruckzunahme, die die Säure hervorbringt. Sind  $m$  mm<sup>3</sup> Milchsäure in  $v_F$  cm<sup>3</sup> Serum eingekippt worden, so ist

$$\Delta u = \frac{m - H \cdot K_{CO_2}}{v_F}, \quad \Delta\varrho = \frac{(p_0 + h)\beta}{(p_0 + h)\beta + B_0} - \frac{p_0\beta}{p_0\beta + B_0},$$

wobei  $p_0$  den Anfangsdruck der Kohlensäure und  $B_0$  die Anfangskonzentration des Bicarbonats bedeuten. Durch beide ist auch  $p_0$  und  $c_0$  gegeben, so daß die übrigen Größen berechnet werden können. Beispiel: Die Anfangsbedingungen waren  $B_0 = 455$ ,  $p_0 = 470$ ,  $c_0 = 481$ ,  $\varrho_0 = 0,0528$ . Es erfolgte bei Ansäuerung von 1 cm<sup>3</sup> Serum mit 33,5 mm<sup>3</sup> Milchsäure, die in 0,1 cm<sup>3</sup> 0,9proz. NaCl-Lösung gelöst war, eine Druckzunahme von 16,1 mm; hieraus folgt durch Berechnung in der vorher angegebenen Art  $\Delta u$

$$= 5,45 \text{ mm}^3, \Delta\varrho = 0,0047, (\Delta p)_c = 50,2 \text{ mm}^3, \left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_c = 0,108$$

für  $\Delta p$  ca 50 mm. Die für Milchsäure gültigen Größen hängen von der Größe des Gefäßes und dem Volumen des eingefüllten Serums ab, wie leicht gezeigt werden kann. Es ist für  $v_F = 8$ ;  $K_{CO_2}$

$$= 0,91: (\Delta p)_M = 39,3 \text{ mm} \text{ und } \left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,138 \text{ für } \Delta p \text{ ca. } 39; \text{ für}$$

$v_F = 1,1$ ;  $K_{CO_2} = 1,71$ ;  $(\Delta p)_M = 16,1$  mm und  $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,338$  für  $\Delta p$  ca. 16.

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung der Unbekannten bietet der Verdünnungsversuch. Ändert sich nämlich beim Verdünnen von  $v_F$  cm<sup>3</sup> Serum mit  $e$  cm<sup>3</sup> NaCl-Lösung (0,9%) der Druck um  $h$  mm, so ist

$$\Delta u = -\frac{hK_{CO_2}}{v_F + e};$$

$$\Delta \rho = \frac{(p_0 + h)\beta}{(p_0 + h)\beta + B_0 - \frac{v_F}{v_F + e} - \frac{h \cdot K_{CO_2}}{v_F + e}} - \frac{p_0\beta}{p_0\beta + B_0},$$

wobei  $p_0$  und  $B_0$  die anfänglichen Werte sind, durch die auch  $\rho_0$  und  $c_0$  gegeben sind (siehe oben). Die für die Gefäßkonstante gesuchten Quotienten  $du/dp$  sind also nach den bereits entwickelten Formeln zu berechnen. Beim Versuch soll  $h_{CO_2} = p$  nicht kleiner als 15 mm wegen der Ablesungsfehler und nicht größer als 40 bis 50 mm sein, damit keine zu große Änderung der Konzentrationen (Bic. u. H<sup>+</sup>) eintreten.

Wegen der Nebenreaktion, die z. B. ein Teil der entstehenden Milchsäure mit Serumbestandteilen eingeht, ist die ausgetriebene CO<sub>2</sub> der Milchsäure nicht äquivalent. Der Quotient  $Q_{CO_2}$ , der bisher nur für diese, aus einer Ringerlösung ausgetriebenen CO<sub>2</sub> galt, findet jetzt ausschließlich auf die neugebildete, also z. B. bei einer Atmung entstehende CO<sub>2</sub> Anwendung, die entstehende Milchsäure ist in dem Quotienten  $Q_M$ , die gesamte Säure in dem Quotienten  $Q_S$  enthalten, so daß die Gleichungen bestehen:

$$Q_{O_2} = \frac{x_{O_2}}{m \cdot t}; \quad Q_{CO_2} = \frac{x_{CO_2}}{m \cdot t}; \quad Q_M = \frac{x_M}{m \cdot t}; \quad Q_S = \frac{x_M + x_{CO_2}}{m \cdot t},$$

wobei  $m$  mg Gewebe (Trockengewicht),  $t$  Stunden,  $x$  die entwickelte Menge mm<sup>3</sup> Sauerstoff, Kohlensäure oder Milchsäure bedeuten.

Beim Verfolgen der Glykolyse im Blut durch Feststellung der Zuckerabnahme verfahren Rona und Wilenko<sup>1)</sup> so, daß sie dem steril entnommenen, mit sterilen Glasperlen defibrinierten Blut zunächst, um größere Ausschläge im Zuckerumsatz zu erzielen, eine bestimmte Menge Traubenzucker zusetzten. Hohe

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 62, S. 1. 1914.

Zuckerkonzentration bewirkt zunächst, bis zu etwa 0,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> eine Zunahme der absoluten Menge an zerstörtem Zucker. Bei noch höherer (schon bei ca. 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) ist die Glykolyse stark gehemmt. Die *H*-Konzentration des Blutes wurde durch Zugabe von Essigsäure oder von primärem Natriumphosphat erhöht (Hämolyse darf nicht eintreten); Kontrollproben wurden mit einer entsprechenden Menge Natriumacetat bzw. mit einem Gemisch von primärem und sekundärem Natriumphosphat versetzt. Bei einer *H*-Ionenkonzentration von etwa  $4-6 \cdot 10^{-7}$  war die Glykolyse bereits aufgehoben, bei einer von  $2-3 \cdot 10^{-7}$  ist sie gegen die Norm deutlich herabgesetzt. Bei der *H*-Ionenkonzentration des Blutes geht die Glykolyse anscheinend am besten vor sich. — Von Zeit zu Zeit wurden Proben, die bei 37<sup>0</sup> gehalten wurden, zur Zuckerbestimmung entnommen: Die Zuckerbestimmung erfolgte nach Enteiweißung des Blutes mit kolloidalem Eisenhydroxyd nach Rona und Michaelis mit der Bertrandschen Methode. Vorteilhafter ist jedoch die Anwendung der Methode von Hagedorn-Jensen.

## Eiweißspaltende Fermente.

### Pepsin.

Pepsin spaltet alle genuinen Eiweißkörper bei saurer Reaktion bis zu Albumosen und Peptonen. Protamine, Polypeptide werden nicht angegriffen<sup>1)</sup>.

#### Darstellungsmethoden.

Darstellung nach Pekelharing<sup>2)</sup>. Die Fundusmucosa von 10 Schweinemägen wird zerhackt und mit 6 l 5 proz. Salz-

<sup>1)</sup> Über die Systematik der proteolytischen Fermente vgl. Oppenheimer, Die Fermente, S. 808. Nach neueren Untersuchungen (Waldschmidt-Leitz: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 149, S. 211. 1925) sind folgende Typen proteolytischer Enzyme zu unterscheiden: Zur ersten Gruppe, den Peptidasen, gehört das Erepsin, dessen spezifische Substrate einfache Peptide z. B. Di- oder Tripeptide sind; eine zweite Gruppe umfaßt die Enzyme vom Typus des nichtaktivierten Trypsins, dessen Wirkung bis jetzt auf Pepton (ex albumine, Merck), auf Clupein, auf Thymushiston nachgewiesen worden ist; zu der dritten Gruppe gehört das aktivierte Trypsin, also das System Trypsin + Enterokinase, zu der vierten Gruppe das Pepsin, das auch das gegen Trypsin resistente Serumalbumin und Eieralbumin schnell abbaut. Nur Mucin wird leichter von Tryptasen als von Pepsin gelöst; das liegt wohl an seiner stark sauren Natur resp. der festen Salzbindung an die Chondroitin-Gruppe, die bei schwach alkalischer Reaktion leichter zerfällt. (Vgl. Oppenheimer: Die Fermente, S. 839.)

<sup>2)</sup> Pekelharing, C. A.: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 22, S. 233. 1896/97 und Bd. 35, S. 8. 1902.

säure 5 Tage lang bei 37° digeriert. Dann wird zur Herstellung eines geeigneten Filters in einen auf eine Saugflasche aufgesetzten Trichter eine etwa 1 cm dicke, konisch abgeschliffene, von zahlreichen Öffnungen perforierte Ebonitplatte gelegt. Dieselbe wird mit feuchtem Filtrierpapier bedeckt, und dann wird unter Saugen ein dünner Brei von in Wasser fein zerriebenem Filtrierpapier daraufgegossen. Durch die so erhaltene, 2—3 cm dicke, feste Schicht wird die zu filtrierende Flüssigkeit durchgesogen. Die auf diese Weise völlig geklärte Verdauungsflüssigkeit wird dann 15—20 Std. gegen strömendes Leitungswasser dialysiert. Dabei entsteht ein Niederschlag, der abzentrifugiert und in 0,2 proz. HCl gelöst wird (am besten digeriert man etwa 1 Std. bei 37° mit der Säure). Die filtrierte klare Lösung wird gegen destilliertes Wasser wieder 15—20 Std. dialysiert. Der dabei entstehende Niederschlag wird abfiltriert, wieder in 0,2 proz. HCl gelöst, filtriert und wieder dialysiert. Der erneut entstandene Niederschlag wird wieder abfiltriert, mit wenig destilliertem Wasser gewaschen, zwischen Filtrierpapier ausgepreßt, vom Filter genommen und über Schwefelsäure getrocknet.

Aus dem ersten Filtrat der mit Salzsäure digerierten Mucosa kann man noch einen großen Teil des darin gelösten Fermentes gewinnen, indem man die Flüssigkeit mit basischem Bleiacetat und Ammoniak behandelt. Der voluminöse Niederschlag wird filtriert, der Niederschlag vom Filter genommen, mit einer gesättigten Oxalsäurelösung versetzt und vom Bleioxalat abfiltriert.

Die vom Bleioxalat abfiltrierte, dialysierte, und vom ausgeschiedenen Pepsin befreite Lösung enthält noch viel Pepsin. Um aus ihr das Ferment zu gewinnen, wird die Lösung mit Ammoniumsulfat gesättigt, wobei ein klebriger, flockiger Niederschlag entsteht. Der feuchte Niederschlag wird 24—36 Std. gegen strömendes Leitungswasser, dann gegen 0,2 proz. HCl dialysiert, der im Dialysator gebildete Niederschlag abzentrifugiert, der Niederschlag bei 37° in 0,2 proz. Salzsäure gelöst und wie oben beschrieben behandelt.

Darstellung nach Hammarsten<sup>1)</sup>. Hammarsten verwandte zur Pepsindarstellung die Schleimhaut von Schwein, Kuh, Pferd oder Hund; der Pylorusteil wurde immer abgetrennt und nur der übrige Teil der Magenschleimhaut, speziell vom Schweinemagen nur die enzymreichere, dunkler gefärbte Mittelpartie benutzt. Die Schleimhaut wird abgetrennt und in der Fleisch-

<sup>1)</sup> Hammarsten: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 108, S. 243. 1919, vgl. auch Z. physiol. Chem. Bd. 94, 291, 1915.



mühle gemahlen. Beim Rinder- und Kalbsmagen wird die Drüsen-schicht mit einem Uhrglas abgeschabt. Die zerhackte bzw. abgeschabte Schleimhaut wird 2—3 Tage unter mehrmaligem Umschütteln in einem kalten Zimmer (8—10°) mit 0,2 proz. Salzsäure im Verhältnis von 10 Teilen Säure auf 1 Teil Schleimhaut behandelt und dann filtriert. Die Pferdema-genauszüge waren immer stark gefärbt. Das Filtrat muß klar sein, was man durch wiederholtes Filtrieren erreicht. Dann wird das Filtrat bei gewöhnlicher Zimmertemperatur mit NaCl halbgesättigt, wodurch das Enzym als hyaline Masse an die Oberfläche steigt. Die untere Flüssigkeit wird abgehoben und die ausgefällte Masse zwischen Filtrierpapier stark ausgepreßt, zerschnitten und in der Kälte oder bei Zimmertemperatur in 0,2 proz. Salzsäure gelöst, wozu längere Zeit nötig ist; man nimmt auf 1 l Auszug 150—200 cm<sup>3</sup> der 0,2 proz. Säure. Die klar filtrierte Lösung wird nochmals mit gesättigter NaCl-Lösung gefällt, in 0,2 proz. HCl gelöst. Man dialysiert gegen destilliertes Wasser, wobei eine gequollene Masse ausfällt, und trocknet im Exsiccator (oder durch kurzdauernde Alkohol-Ätherbehandlung, was indessen weniger empfehlenswert ist).

Bei neugeborenen Kälbern oder jungen Saugkälbern ist folgendes Verfahren von Hammarsten recht brauchbar. Den Auszug (wie oben bereitet) neutralisiert man mit  $\frac{1}{2}$  (zur Absättigung der größten Menge Säure) und dann mit  $\frac{1}{10}$ -n-Lauge; die hierbei auftretende Fällung wird nach 12—18 Std. abzentrifugiert, die mit Wasser abgespülte Fällung wird in 0,2 proz. HCl gelöst und mit dem gleichen Volumen gesättigter NaCl-Lösung gefällt, dann weiter wie oben behandelt. Das Filtrat von der Neutralisationsfällung enthält noch viel Enzym, das sich bei der Dialyse des Filtrates gegen Wasser zum großen Teil mit der Eiweißfällung ausscheidet. Diese durch Dialyse erhaltene, abzentrifugierte Fällung wird ganz so wie die Neutralisationsfällung behandelt.

Aus Magensaft kann man nach Pekelharing das Ferment gewinnen, indem man den filtrierten Magensaft etwa 40 Std. bei einer nicht weit über 0° gelegenen Temperatur gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die trübe Flüssigkeit wird zentrifugiert, der Bodensatz mit einem geringen Quantum der Flüssigkeit (der größere Teil wird abgegossen) auf ein kleines Filter gebracht, mit wenig destilliertem Wasser gewaschen, vom Filter abgehoben und im Exsiccator getrocknet. Um aus dem Filtrat weitere Mengen zu erhalten, sättigt man dasselbe halb mit Ammonsulfat, befreit den entstandenen Niederschlag durch Dialyse vom Salz, löst ihn bei 37° in möglichst wenig 0,2 proz. HCl, dialysiert wieder, filtriert den entstandenen Niederschlag und trocknet wie oben ausgeführt.

## Nachweis und Bestimmung.

Der Nachweis des Pepsins beruht auf der Fähigkeit des Ferments, bei stark saurer Reaktion geronnenes Eiweiß zu lösen. Man benutzt eine so stark salzsaure Reaktion (0,1—0,2 proz.), daß andere Fermente unwirksam werden. Als Eiweißsubstrat nimmt man entweder hartgesottenes Hühnereiweiß oder gekochtes Fibrin oder Elastin aus dem Nackenband (Ligamentum nuchae) des Rindes, das man nach Abderhalden und Strauch<sup>1)</sup> wie folgt darstellt. Die in 0,5 cm breite Streifen geschnittenen Bänder werden einen Tag mit 1 prozentiger KOH digeriert, mit Wasser ausgekocht, 3 Tage in 1 prozentige Essigsäure gelegt, nach nochmaligem Aufkochen einen Tag einer 5 prozentigen HCl bei Zimmertemperatur ausgesetzt. Nach gründlicher Wässerung wird dann im Soxhlet mit Alkoholäther extrahiert<sup>2)</sup>. — Nach einigen Stunden ist das betreffende Eiweiß (z. B. Fibrin) in der salzsauren, das Pepsin enthaltenden Lösung verdaut. Selbstverständlich kommt einer solchen Prüfung nur die Bedeutung einer ersten Orientierung zu. Als Kontrolle dient immer eine unter gleichen Bedingungen, nur ohne Zusatz der Pepsinlösung angesetzte Probe.

Es existiert eine große Zahl von Methoden, die heute nur noch historisches Interesse verdienen. Eine solche ist z. B. die Methode von Mett, der eine Hühnereiweißlösung in Capillaren aufzog, sie durch Kochen koagulierte und aus der Länge der verdauten Eiweißsäule auf die Fermentmenge schloß.

Methode nach Grützner<sup>3)</sup>. Die Methode beruht darauf, daß Fibrin, welches mit Farblösungen (Carmin, Spritblau) getränkt ist, diese Farben bei der angewandten Säurekonzentration nicht abgibt, daß aber der Farbstoff bei der Verdauung des Fibrins in Lösung geht. Mittels Vergleichsfarblösungen wird auf die Stärke der Fermentlösung geschlossen. Sorgfältig ausgewaschenes, in Glycerin aufbewahrtes Fibrin wird in einer 0,25—0,50 proz. ammoniakalischen Carminlösung bis zur dunkelroten Farbe gefärbt. Bei den Versuchen wird dieses Carminfibrin durch Auswaschen vom Glycerin befreit, mit der 5—6fachen Menge 0,1 proz. HCl übergossen,

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 71, S. 320. 1911.

<sup>2)</sup> Vgl. auch Abderhalden u. Wachsmuth: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 71, S. 339. 1911.

<sup>3)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 8, S. 452. 1874 und Bd. 144, S. 545. 1912. Waldschmidt, W.: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 143, S. 189. 1911.

und nochmals mit der Schere zerkleinert. Eine kleine Portion von diesen Flöckchen wird in Reagensgläsern mit 0,1 proz. HCl und mit der zu prüfenden Pepsinlösung übergossen. Eine Kontrolle mit Säure allein muß jedesmal angestellt werden; das Fibrin muß gleichmäßig verrieben sein und jede Probe dieselbe Fibrinmenge enthalten<sup>1)</sup>. Smorodinzew und Adowa<sup>2)</sup> benutzen zum Färben für einen Gewichtsteil des gut gewaschenen und ausgepreßten Fibrins vier Gewichtsteile der 5 promill. Glycerinlösung von Diphenylrosanilin (Ceresblau III, Spritblau-Bläulich, Bayer & Co.).

Methode nach Volhard und Löhlein<sup>3)</sup>. Die Methode beruht darauf, daß reines, unverändertes Casein in Salzsäure (0,1 proz.) gelöst durch Natriumsulfat vollständig gefällt wird. Bei fortschreitender Peptonisierung der Caseinlösung nimmt die Acidität des Filtrates zu, wenn man die Verdauung der Caseinlösung durch Aussalzen unterbricht und filtriert. Die durch das Natriumsulfat nicht mehr fällbaren salzsauren Peptone passieren das Filter und verursachen die Aciditätszunahme.

Ausführung: 100 g Casein werden in 1 l aq. dest. unter Schütteln eingeweicht, sodann 80 cm<sup>3</sup> n-NaOH zugefügt und mit aq. dest. auf 2000 cm<sup>3</sup> aufgefüllt; man wärmt langsam an bis zur vollkommenen Lösung und erhitzt dann rasch auf 85—90°, um eventuelle Spuren proteolytischer Enzyme unwirksam zu machen; nach dem Abkühlen setzt man einige Tropfen Toluol zu. Diese Caseinlösung ist lange haltbar. Als Digestionsgefäß dienen langhalsige Flaschen, welche mit Marken von 300 und 400 cm<sup>3</sup> versehen sind. Man mißt aus einer Bürette genau 11 cm<sup>3</sup> n-HCl in die Flasche, füllt mit aq. dest. auf etwa 150 ccm auf und gibt dann unter Schütteln 100 cm<sup>3</sup> der beschriebenen Na-Caseinlösung am besten aus einer durch T-Rohr mit der Vorratsflasche verbundenen, umgekehrt eingespannten 100 cm<sup>3</sup> Pipette zu. Dann wird eine beliebige, aber genau zu bestimmende Menge des zu untersuchenden Magensaftes (oder einer anderen pepsinhaltigen Lösung) zugefügt, am besten, nachdem die Mischung schon vorher im Wasserbad von 40° erwärmt wurde, und mit Wasser auf 300 aufgefüllt. Die Mischung wird beliebige, aber genau zu be-

<sup>1)</sup> Vgl. Hammarsten: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 74, S. 142. (152) 1911.

<sup>2)</sup> Smorodinzew und Adowa: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 149, S. 173. 1925.

<sup>3)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 49; S. 2129; Hofmeisters Ber. Bd. 7, S. 120. 1906.

stimmende Zeit, z. B. 1 Std. lang, im Wasserbad von 40° gehalten, dann wird mit 100 cm<sup>3</sup> 20proz. Natriumsulfatlösung auf 400 aufgefüllt. Diese Lösung unterbricht die Pepsinwirkung sofort und fällt das bis dahin unverändert gebliebene Casein in Flocken aus, während die entstandenen salzsauren Peptone bei der nun folgenden Filtration ins Filtrat gehen. Die Acidität von 100 oder 200 cm<sup>3</sup> des Filtrats wird durch Titration mit  $\frac{1}{10}$ -n-NaOH bestimmt. Von der Gesamtacidität des Filtrats wird die ein für allemal bestimmte, auf ihre Konstanz von Zeit zu Zeit zu prüfende Acidität der Stammlösung subtrahiert; von der Restsumme ist der Säurewert des zugesetzten Magensaftes noch abzuziehen. Als Indicator dient Phenolphthalein.

Methode nach Fuld und Levison<sup>1)</sup>. Edestan, das sich aus Edestin bei der Einwirkung verdünnter Säuren bildet, wird durch die Wirkung des Pepsins vollständig in Albumosen übergeführt, die durch Kochsalz nicht mehr ausgefällt werden, während das nicht verdaute Edestan ausfällt.

Erforderliche Lösungen:

1. 1 promillige Edestinlösung (0,1 g Edestin [Merck] wird in 100 cm<sup>3</sup> 0,03-n-HCl unter Kochen aufgelöst, wobei sich reines Edestin glatt lösen soll).

2. Kochsalz in Substanz.

Ausführung: Die Fermentlösung des entsprechend (z. B. 20fach) verdünnten Magensaftes wird in eine Reihe trockener Reagensgläser mittels einer in Hundertstel cm<sup>3</sup> geteilten 1-cm<sup>3</sup>-Pipette in fallenden Mengen eingefüllt. Rasch arbeitend bringt man in diese Gläser nun die gewählte Menge Edestinlösung, z. B. 2 cm<sup>3</sup>. Man läßt die Proben 30 Min. bei Zimmertemperatur, trägt festes Kochsalz in die Proben ein, schüttelt einmal um und sieht zu, ob eine Trübung auftritt oder nicht.

Zur Berechnung der Pepsinwerte nimmt man die Anzahl cm<sup>3</sup> Pepsinlösung, die eben noch ausreichte, 2 cm<sup>3</sup> Edestinlösung innerhalb einer halben Stunde zu verdauen, und berechnet, wieviel cm<sup>3</sup> der Edestinlösung von 1,0 cm<sup>3</sup> der Fermentlösung innerhalb einer halben Stunde verdaut werden. Wenn also von der 20fachen Verdünnung der Fermentlösung 0,25 cm<sup>3</sup> eben ausreichen, um 2 cm<sup>3</sup> Edestinlösung zu verdauen, so ist die gesuchte Zahl 160.

Man bezeichnet demnach die Fermentlösung als 160fach.

---

<sup>1)</sup> E. Fuld und L. A. Levison: Biochem. Zeitschr. Bd. 6, S. 473. 1907.

Modifikation nach Ege<sup>1)</sup>.

Ege bestimmt nicht die Fermentkonzentration, bei der die Lösung nach dem Salzzusatz noch klar bleibt, sondern er bestimmt einen bestimmten Trübungsgrad nach Salzzusatz. Je mehr Salzlösung zugesetzt werden muß, bevor der bestimmte Fällungsgrad eintritt, um so kräftiger war die Pepsinverdauung und um so größer die Pepsinkonzentration.

Erforderliche Lösungen:

1. Edestinlösung: 8,00 g Edestin werden in etwa 1,5 l H<sub>2</sub>O aufgeschüttelt; 300 g Weinsäure werden in etwa 2 l Wasser gelöst und die Lösung bis zum Kochen erwärmt. Man gießt die warme Weinsäurelösung in die Edestinaufschlammung, wodurch sich das Edestin momentan löst; darauf werden 40 cm<sup>3</sup> einer 1 proz. Sublimatlösung (dieses hemmt die Pepsinwirkung nicht, da es vom Edestin gebunden wird) zugesetzt. Es wird abgekühlt und bis zu 4 l verdünnt, danach filtriert.

2. 20 proz. NaCl-Lösung.

3. Ammonsulfatlösung (70 g + 100 cm<sup>3</sup> Wasser).

4. Gummiarabicumlösung (0,5 g Gummi, 0,01 g Sublimat auf 100 cm<sup>3</sup> Wasser).

Ausführung: Zu 10 cm<sup>3</sup> der Edestinlösung werden je 0,1 bis 1,0 cm<sup>3</sup> der zu untersuchenden Flüssigkeit gegeben. Man arbeitet immer mit 11 cm<sup>3</sup> Lösung, wird weniger als 1 cm<sup>3</sup> der Fermentlösung zugegeben, so wird mit Wasser auf 11 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Die Verdauung findet in Reagensgläsern — 21 mm Durchmesser — bei 40° im Wasserthermostaten statt; nach Ablauf der Verdauungsperiode, in der Regel nach einer halben Stunde, wird das Reagensglas etwa 5 Min. in kochendes Wasser gebracht, und dann abgekühlt.

Der  $p_h$  der Lösung beträgt 1,5—1,6.

Man setzt 1 cm<sup>3</sup> der Gummiarabicumlösung als Schutzkolloid zu und titriert. Die Titration wird immer im Lauf derselben Zeit (3 Min.) durchgeführt. Man beginnt die Titration mit der NaCl-Lösung, und wenn sie auch nach Zusatz 3,0 cm<sup>3</sup> NaCl nicht beendet oder beinahe beendet ist, setzt man sie mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fort. Zweckmäßig ist es, zur Ablesung einen Lichtkasten mit gleichmäßiger Lichtquelle zu benutzen. Als Endpunkt der Titration gilt der Fällungsgrad, der das Lesen einer hinter dem Glase angebrachten Schrift eben verhindert.

Zum Vergleich wird durch verschiedene Verdünnungen eines

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 127, S. 125. 1923.

konstanten und möglichst reinen Pepsins (Armourpepsin) eine Untersuchungsreihe hergestellt.

Beispiel: Reihe für eine 0,2 proz. Edestinlösung,  $\frac{1}{2}$ stündiger Verdauungsversuch bei  $40^{\circ}$ .

Pepsin in $\gamma = 10^{-3}$ mg Armourpepsin	20 % NaCl $\text{cm}^3$	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 70 g + 100 $\text{cm}^3$ $\text{H}_2\text{O}$ $\text{cm}^3$
0	1,50	—
50	1,70	—
100	2,28	—
200	4,30	—
200	3,00	0,40
200	—	1,15
400	—	1,90
500	—	2,25
600	—	2,55
700	—	3,20
800	—	3,50
900	—	3,70
1000	—	4,40
1400	—	7,40
1800	—	10,00

Methode nach Jakoby<sup>1)</sup>. Die Fähigkeit des Pepsins, eine trübe Ricinlösung aufzuhellen, wird benutzt.

Erforderliche Lösungen: 1. 1 g Ricin (Vereinigte Chemische Werke Charlottenburg oder Merck) werden in 100  $\text{cm}^3$  1,5 proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

2.  $\frac{1}{10}$ -n-HCl.

3. Gekochter Magensaft.

4. Verdünnter Magensaft (1  $\text{cm}^3$  Saft wird mit 100  $\text{cm}^3$  Aq. dest. verdünnt), oder sonstige pepsinhaltige Lösung.

Ausführung: In eine Reihe z. B. 5 mit fortlaufenden Zahlen versehene Reagensgläser füllt man mit einer graduierten Pipette je 2  $\text{cm}^3$  der Ricinlösung. Dann setzt man mit einer anderen Pipette zu jedem Glas 0,5  $\text{cm}^3$   $\frac{1}{10}$ -n-HCl hinzu, worauf sich sämtliche Portionen stark trüben. Nun füllt man in das erste Gläschen 1  $\text{cm}^3$  der aufgekochten Fermentlösung, in das zweite 0,9, in das dritte 0,8, in das vierte 0,5 und in das fünfte 0  $\text{cm}^3$ . Dann bringt man von der Fermentlösung in Gläschen 1: 0  $\text{cm}^3$ , in 2: 0,1  $\text{cm}^3$ , in 3: 0,2  $\text{cm}^3$ , in 4: 0,5  $\text{cm}^3$  und in 5: 1,0  $\text{cm}^3$ , so daß in jedem Reagensglas insgesamt 3,5  $\text{cm}^3$  Flüssigkeit enthalten sind. Hierauf werden die Gläser zugekorkt und 3 Stunden in den Brutschrank

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 53. 1906.

gestellt. Es wird festgestellt, bei welcher Verdünnung das Gemisch eine vollkommen klare Lösung darstellt.

Methodenach L. Michaelis und Rothstein<sup>1)</sup>. Zum Nachweis der Fermentwirkung wird die Aufhellung eines durch Sulfosalicylsäure getrüben Serums benutzt. Infolge der großen Stärke dieser Säure erhält man leicht die zur Pepsinwirkung optimale Wasserstoffionenkonzentration. In einem Reihenversuch wird diejenige Verdünnung der zu untersuchenden Pepsinlösung aufgesucht, bei der die Aufhellung mit einer Kontrollfermentlösung übereinstimmt.

Erforderliche Lösungen: 1. Sulfosalicylsäure-Eiweißlösung. Menschliches Blutserum mit Wasser 12fach verdünnt oder Hammelserum 15fach verdünnt wird mit 10proz. Sulfosalicylsäurelösung unter Umrühren versetzt, bis Kongopapier eben violett gefärbt wird; eine eben deutliche Violettfärbung entspricht etwa  $p_h = 2,0$  bis 1,8, dem Optimum der Pepsinverdauung. Die Eiweißlösung ist dann dick milchig getrübt, ohne Flocken. Die Menge der Sulfosalicylsäure beträgt  $\frac{2}{3}$ — $\frac{3}{4}$  der Menge des jeweils angewandten unverdünnten Serums.

#### 2. 10proz. NaCl-Lösung.

Ausführung: In eine Reihe von Reagensgläsern werden je 1 cm<sup>3</sup> der Fermentlösung in verschiedenen Verdünnungen mit je 5 cm<sup>3</sup> der Sulfosalicylsäure-Eiweißmischung gebracht, ebenso wird 1 cm<sup>3</sup> der Kontrollfermentlösung mit 5 cm<sup>3</sup> der Eiweißmischung vermischt. Die Gläschen werden dann in ein Wasserbad von 38—40° gestellt und die Aufhellung beobachtet. Wie bei der Labbestimmung (siehe diese), werden in einem Vorversuche erst gröbere Abstufungen der Fermentverdünnung hergestellt, dann werden feinere Abstufungen gewählt. Die feinere Reihe wird so angesetzt, daß von derjenigen Fermentmischung, welche sich im Vorversuch als eben noch zu stark erwiesen hatte, in eine Reihe von Gläschen 1,0; 0,8; 0,64; 0,52 cm<sup>3</sup> eingefüllt, mit Wasser auf 1,0 cm<sup>3</sup> aufgefüllt und dazu je 5 cm<sup>3</sup> der Eiweißlösung gegeben werden. Die Aufhellung ist in der Regel nach 10 Min. soweit fortgeschritten, daß Unterschiede in der Aufhellung deutlich werden. Diejenige Verdünnung, die der Kontrolle parallel geht, ist definitionsgemäß gleich einer Pepsineinheit.

Herstellung der Pepsinkontrolle. Ein gutes festes Pepsinpräparat wird mit der 10fachen Menge 10proz. NaCl-Lösung

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 60. 1920. Vgl. auch Dtsch. med. Wochenschr. 1918, S. 685. — Vgl. auch Hollstein: Cremers Beitr. Bd. 2, S. 11. 1922. — Vgl. auch Gyemant, A.: Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 155. 1920.

versetzt, etwa eine Woche bei Zimmertemperatur aufbewahrt, filtriert, mit der gleichen Menge Glycerin versetzt und im Eisschrank aufbewahrt. Eine solche Lösung ist unbegrenzt haltbar. Von dieser Standardfermentlösung wird eine Verdünnung zum Versuch hergestellt, so daß  $0,25 \text{ cm}^3$  in  $25 \text{ cm}^3$  destilliertem Wasser (nicht aufgekochtes oder Leitfähigkeitswasser) gelöst werden. Die Abmessung dieser  $0,25 \text{ cm}^3$  muß besonders sorgfältig geschehen (Pipette  $1 \text{ cm}^3$  in  $1/100$  geteilt, auf Ausblasen geeicht, außen abtupfen, mehrmals Aufsaugen und Ausblasen). Diese 100fache Verdünnung ist die Vergleichslösung; sie muß täglich frisch bereitet werden.

Methode nach Glässner<sup>1)</sup>. Globin, das aus Rinderblut dargestellt wird, wird aus salzsaurer Lösung durch Ammoniak gefällt. Nach Verdauung des Globins bleibt die  $\text{NH}_3$ -Fällung aus.

Globinlösung<sup>2)</sup>.  $100 \text{ cm}^3$  einer Hämoglobinlösung, die so gewonnen wird, daß geschlagenes Rinderblut vom Serum befreit, mit phys. Kochsalzlösung 3—5 mal gewaschen und die Blutkörperchenaufschwemmung so lange mit destilliertem Wasser versetzt wird, bis die Lösung lackfarben ist. Dann wird mit  $200 \text{ cm}^3$  (96 $\%$ ) Eisessig versetzt, die Flüssigkeit in 2 l destilliertes Wasser eingetragen, die tiefbraune Lösung in der Schüttelmaschine mit stark aktiver Tierkohle 1 Std. lang geschüttelt und auf einer Nutsche durch Papierwolle abgesaugt; nach 2—3maliger Wiederholung dieser Behandlung mit Tierkohle erhält man eine nur schwach gefärbte Lösung, aus der durch Ammoniakzusatz das Globin fast völlig weiß ausfällt. Das Globin wird auf dem Filter mit wenig  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in  $600 \text{ cm}^3$   $1/10$ -n-HCl gelöst. Diese Lösung kann durch Kochen sterilisiert werden und ist monatelang haltbar.

Ausführung (für die Bestimmung des Pepsins im Magensaft): Man gibt in ein Reagensglas  $2 \text{ cm}^3$  filtrierten Magensaft, in 9 weitere je  $1 \text{ cm}^3$   $1/10$ -n-HCl. In das zweite Glas kommt  $1 \text{ cm}^3$  unverdünnter Magensaft, man mischt, überträgt  $1 \text{ cm}^3$  des Gemisches in Glas 3, mischt davon  $1 \text{ cm}^3$  in das Glas 4 usw.; bei der Probe 10 gießt man nach dem Mischen  $1 \text{ cm}^3$  weg. So erhält man die geometrischen Reihen von  $1/1$ ,  $1/2$ ,  $1/4$ ,  $1/8$ ,  $1/16$ ,  $1/32$ ,  $1/64$ ,  $1/128$ ,  $1/256$ ,  $1/512$ . In jedes Röhrchen wird  $1 \text{ cm}^3$  Globinlösung eingefüllt und nach gutem Mischen werden die Gläser 15 Min. in ein Wasserbad von  $40^\circ$  eingesetzt.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 127, S. 312. 1922.

<sup>2)</sup> Vgl. Strauß u. Grützner: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 112, S. 167. 1921.



Nach Zusatz von 3—5 Tropfen einer 10proz. Ammoniumchloridlösung wird das Globin mit je 1—2 cm<sup>3</sup> 1proz. Ammoniaks gefällt. Es entsteht ein feinflockiger Niederschlag in den Röhren, die noch Globin in unverdaulichem Zustand enthalten. Kontrollen werden mit gekochtem Magensaft angestellt. Zur feineren Bestimmung wird auch hier eine Zwischenserie eingeschoben.

Methode von Groß<sup>1)</sup>. Aus einer sauren Caseinlösung wird durch Zusatz von essigsaurem Natrium das Casein gefällt; die Abbauprodukte des Caseins bleiben in Lösung.

Erforderliche Lösungen: 1. 1 promillige saure Caseinlösung. 1,0 g Caseinum puriss. nach Hammarsten wird mit 16 cm<sup>3</sup> einer 25proz. Salzsäure (spez. Gew. 1,124) in 1 l Meßkolben auf dem Wasserbad gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

2. Eine 20proz. Lösung von essigsaurem Natrium.

Ausführung: Eine Reihe von Reagensgläsern wird mit absteigenden Mengen des vorher filtrierten Mageninhaltes oder Pepsinlösung beschickt, wobei die nötigen Verdünnungen mit destilliertem Wasser hergestellt werden können. Dann werden zu jedem Gläschen 10 cm<sup>3</sup> der Caseinlösung (zweckmäßig vorher auf 39–40° anwärmen) zugegeben und die ganze Reihe wird auf 15 Min. in ein Wasserbad von 38–40° gesetzt und dann das unverdaut gebliebene Casein durch einige Tropfen konzentrierter Na-Acetatlösung ausgefällt. Man bestimmt die geringste Menge an Magensaft, die in 15 Min. alles Casein verdaut hat.

Berechnung: Als Pepsineinheit gilt diejenige Menge Magensaft, die noch imstande ist, 10 cm<sup>3</sup> Caseinlösung in 15 Min. so zu verdauen, daß auf Zusatz der Natriumacetatlösung keine Trübung mehr auftritt und berechnet hieraus die Zahl der Einheiten für 1 cm<sup>3</sup> Magensaft. Fand man z. B., daß 0,025 cm<sup>3</sup> Magensaft 10 cm<sup>3</sup> Casein noch völlig verdauten, so enthält der Magensaft

$$\frac{1}{0,025} = 40 \text{ Einheiten.}$$

Methode nach Sörensen<sup>2)</sup>. Auch die Methode, deren sich Sörensen bei seinen Arbeiten über das  $p_h$ -Optimum des Pepsins bediente, beruht auf der Ausfällung des unveränderten gebliebenen Eiweißes. Er benutzte Acidalbumin als Substrat und fällte mit einer Gerbsäure- oder Stannochloridlösung; im Filtrat wurde dann der Stickstoff bestimmt.

<sup>1)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 13, S. 643.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 288. 1909.

Erforderliche Lösungen: 1. Acidalbuminlösung, 1,25 proz. 1600 cm<sup>3</sup> einer neutralen, etwa 4proz. Lösung von genuinem Hühnereiweiß werden mit 2640 cm<sup>3</sup> Wasser und 800 cm<sup>3</sup> n-HCl versetzt und die Mischung 22 Std. bei 37° gehalten. Dann werden 30 cm<sup>3</sup> 5 n-Salzsäure und 4 Std. später noch 50 cm<sup>3</sup> 5 n-HCl hinzugefügt, wonach die Mischung noch 23 Std. bei 37° aufbewahrt wird.

2. Pepsinlösung z. B. 4 g Pepsin in 500 cm<sup>3</sup> 0,01 n-HCl (von Sörensen wurde Pepsin „Langebek“ benutzt).

3. n-Natriumacetat.

4. 0,1-n-NaOH.

5. 15 proz. Gerbsäurelösung oder nach Hedin<sup>1)</sup> 100 g Gerbsäure, 50 g NaCl, 50 g Natriumacetat, 50 cm<sup>3</sup> Eisessig auf 1 l H<sub>2</sub>O.

Oder 6. eine Stannochloridlösung<sup>2)</sup>. 50 g Zinn werden in rauchender HCl gelöst unter Zugabe von 1 Tropfen gelösten Platinchlorids. Das Ganze wird bis zu 130 cm<sup>3</sup> eingedampft, auf 1 l Wasser verdünnt und filtriert.

Ausführung: Für jeden Versuch wurden 360 cm<sup>3</sup> Acidalbuminlösung, 50 cm<sup>3</sup> Pepsinlösung und 40 cm<sup>3</sup> einer passenden Mischung von n-NaOH (zur Herstellung der verschiedenen H-Ionenkonzentrationen) vermischt. Die Pepsinlösung wird nach Vorwärmen der Versuchsflüssigkeit, die im Wasserbad von 37 bis 37,1° stand, zugegeben. Zu bestimmten Zeiten und nach unmittlbar vorhergehendem Umschütteln werden Proben von je 30 cm<sup>3</sup> entnommen, die in eisgekühlte 100 cm<sup>3</sup>-Kolben eingegossen werden. Je nachdem mit Gerbsäure oder mit Zinnchlorür gefällt werden soll, werden diese Kolben vorher mit 40 cm<sup>3</sup> bzw. mit 30 cm<sup>3</sup> einer wässrigen Natriumacetatlösung von der Menge NaOH, die zu der Neutralisation der in 30 cm<sup>3</sup> Versuchsflüssigkeit enthaltenen Menge Salzsäure erforderlich ist, beschickt. Die Kolben für die Stannochloridproben enthalten außerdem noch CaCl<sub>2</sub> (15 cm einer 10 proz. CaCl<sub>2</sub>-Lösung). Spätestens 1 Std. nach der Entnahme werden die Proben durch Zugabe von 20 cm<sup>3</sup> Gerbsäurelösung bzw. 30 cm<sup>3</sup> Stannochloridlösung unter gutem Schütteln gefällt. Nach eintägigem Stehen wurden die Meßkolben dann mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und nach gutem und wiederholtem Schütteln noch einen weiteren Tag aufbewahrt, dann wurde filtriert und in einem aliquoten Teil, gewöhnlich in 50 cm<sup>3</sup>, der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Nach Hedin (l. c.) ist die Gerbsäurefällung der mit SnCl<sub>2</sub> vorzuziehen.

<sup>1)</sup> Hedin u. Masay: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 100, S. 263. 1917.

<sup>2)</sup> Schjerning, H.: Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 37, S. 416. 1898.

Methode nach Rona und Kleinmann<sup>1)</sup>. Prinzip: Der Grad der Trübung eines Serum-Sulfosalicylsäuregemisches wird vor und nach der Einwirkung der Fermentlösung auf das Serum nephelometrisch bestimmt. Es besteht genaue Proportionalität zwischen Trübung und Konzentration.

Erforderliche Lösungen: 1. Blutserum (Mensch) verdünnt mit 0,9proz. NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 25.

2. HCl-Lösung von spez. Gew. 1,126 (25 Proz.).

3. Natriumsulfosalicylicum in 20 Proz. Lösung.

4. Fermentlösung; Pepsin Grüber oder D. A. B., wird mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Lösung muß klar und farblos sein. Die notwendige Verdünnung ist bei jedem Pepsinpräparat erst durch einen Vorversuch zu ermitteln. (Z. B. wurden 2 cm<sup>3</sup> der Lösung 1 : 500 bei einem Endvolumen von 67 cm<sup>3</sup> angewendet; die Endverdünnung war demnach 1 : 17000.)

Ausführung: 20 cm<sup>3</sup> der Serumverdünnung 1 : 25 werden in einen 150 cm<sup>3</sup> fassenden Erlenmeyerkolben einpipettiert. Hierzu werden z. B. 7,5 cm<sup>3</sup> n-HCl gegeben. Die Menge HCl richtet sich nach der gewünschten Acidität. Die Mischung wird mit physiologischer Kochsalzlösung auf 75 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. In gleicher Weise wird ein zweiter Versuch angesetzt. Beide Erlenmeyerkolben kommen nun in ein Temperierbad mit mechanischer Rührvorrichtung. Das Bad ist vorher auf 40° eingestellt. Außer den Versuchskölbchen kommen in das Temperierbad in Reagensgläschen zwei Fermentverdünnungen von der Konzentration *a* und *b*, deren Wirkung untersucht werden soll (oder zwei Fermentlösungen derselben Konzentration aber unter verschiedenen Bedingungen). Während Substratlösung und Fermentlösung im Wasserbade vorwärmen, werden soviel Bechergläser hergerichtet, wie Messungspunkte festgelegt werden sollen. Bei der meist üblichen Zahl von 7 Messungen müssen also bei Arbeiten mit 2 parallelen Messungen für den gewählten Vergleich zweier Fermentkonzentrationen 28 Bechergläschen von je etwa 75 cm<sup>3</sup> vorbereitet werden, indem man sie aufs sorgfältigste reinigt, mit destilliertem Wasser spült und im Heizschrank trocknet. Nach Benutzung mit Eiweißlösungen müssen sie stets mit Natronlauge zur Entfernung der letzten Eiweißspuren ausgespült werden.

In die Bechergläschen werden je 5 cm<sup>3</sup> z. B. 1/10-n-NaOH einpipettiert. Diese Natronlauge dient dazu, um 5 cm<sup>3</sup> der Eiweißlösung, die zur Festlegung eines Messungspunktes im Verlauf der Spaltung dem Gemisch entnommen werden,

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 478. 1923.

zu neutralisieren. Die Neutralisation ist notwendig, um die Fermentwirkung plötzlich und vollständig zu unterbrechen.

Sind die Gläser vorbereitet und die Lösungen im Wasserbad temperiert, so werden mit einer in  $\frac{1}{100}$  cm<sup>3</sup> geteilten Pipette aus beiden Erlenmeyerkölbchen zweimal je 5 cm<sup>3</sup> entnommen und je 4,85 cm<sup>3</sup> von diesen in je ein Becherglas einpipettiert. Die rückbleibenden 0,15 cm<sup>3</sup> werden verworfen. In die Bechergläser werden 0,15 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser gegeben. In die zurückbleibenden 65 cm<sup>3</sup> Eiweißlösung werden nunmehr unter Schütteln des Kolbens 2 cm<sup>3</sup> Fermentlösung mit sauberer Pipette eingefüllt. Der Kolben wird hierbei geschüttelt und die Zeit des Zufließenlassens durch Anstellen einer Stoppuhr markiert. In Abständen von 5 Min. werden mittels genau kalibrierter Vollpipette (für jedes Kölbchen ist wegen der verschiedenen Fermentkonzentrationen eine besondere Pipette zu benutzen) je 5 cm<sup>3</sup> der Eiweißlösung den Kölbchen entnommen und in die Bechergläser zu der Natronlauge gegeben. Es ist praktisch, bei den Parallelkolben in Abständen von 2 und 3 Min. zu arbeiten. Vor jeder Entnahme wird die Ferment-Eiweißlösung mittels der Pipette gut durchgerührt.

Wenn man nach 7 Entnahmen, also z. B. nach 30 Min., den Versuch beendigt, mißt man von dem im Erlenmeyerkolben zurückbleibenden Flüssigkeitsreste von etwa 7 cm<sup>3</sup> den  $p_h$ .

Die neutralisierten Eiweißlösungen kann man ruhig stehen lassen oder, was empfehlenswert ist, gleich nephelometrieren. Zu diesem Zweck werden sie mit je 5 cm<sup>3</sup> 25proz. HCl und 8 cm<sup>3</sup> 20proz. Na-Sulfosalicylatlösung versetzt, leicht umgeschüttelt, und nach 3 Minuten im Nephelometer untersucht (vgl. Nephelometrie S. 30).

Die nephelometrische Bestimmung bezieht sich auf die erste Entnahme der noch ungespaltenen Eiweißlösung, deren Gehalt als zu 100 % angesehen wird.

In anderen Versuchen (zur Prüfung des Einflusses der verschiedenen Ionen auf die peptische Spaltung) wurde als Substrat Albumin aus Pferdeserum<sup>1)</sup> benutzt. Dieses wurde so gewonnen, daß Pferdeserum mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, das ausgefallene Globulin abfiltriert, das Filtrat mehrere Wochen gegen fließendes, schließlich gegen destilliertes Wasser dialysiert wurde, bis es keine Ammonium- bzw. SO<sub>4</sub>-Reaktion mehr zeigte. Die mit Toluol versetzte, meist etwas trübe Lösung wurde vor Gebrauch klar filtriert. Die Anordnung der Versuche war: 2,5 cm<sup>3</sup> Serumalbuminlösung, 5 cm<sup>3</sup>

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 150, S. 444. 1924.

HCl fünfmal so stark wie zum Versuch gewünscht (z. B.  $\frac{1}{50}$  n), 12,5 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser (oder Salzlösung). Dann wurden die einzelnen Proben mit destilliertem Wasser auf 23 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Aus der sorgfältig durchmischten Lösung werden 5 cm<sup>3</sup> (zur ersten Entnahme nur 4,5 cm<sup>3</sup> + 0,5 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser verwandt) entnommen, zu den restierenden 18 cm<sup>3</sup> 2 cm<sup>3</sup> Fermentlösung gefügt. Sonst wie oben verfahren. Als ein weiteres Substrat bei der nephelometrischen Messung der Eiweißspaltung diente Casein<sup>1)</sup>. Die Trübung wird hier mit Chinidin hydrochlor. dargestellt. Die Methode wird ausführlich beim Trypsin (S. 258) geschildert.

### Pepsinbestimmung in den Körpersäften.

#### Magensaft.

Man benutzt zur Pepsinbestimmung irgendeine der angegebenen Methoden, die man in sinngemäßer Weise für den gegebenen Fall variieren muß. Dabei ist zu beachten, daß Pepsin in hohem Maße an die gewöhnlichen Nahrungsmittel (Weißbrot, Zwieback, Fleisch) adsorbiert wird<sup>2)</sup>. Die Adsorption ist sehr abhängig von der Reaktion, sie ist maximal bei  $p_h = 3$  bis 4, geringer bei  $p_h = 1$  und gleich Null bei  $p_h = 6,8$ . So erklärt es sich, daß anacide Magensäfte ( $p_h = 3,7$ ) oft kein oder nur wenig freies Pepsin enthalten.

Will man in einem Mageninhalt sowohl die freie als auch die gebundene Pepsinmenge bestimmen, so kann man nach Ege<sup>1)</sup> folgendermaßen verfahren:

a) Freies Pepsin. Die Probe wird sehr gut durchgeschüttelt, so daß die festen Partikelchen gleichmäßig verteilt sind und von der Probe wird ein Teil auf ein kleines, dichtes Filter gegossen. Der erste Teil des Filtrats wird verworfen. Wenn die Wasserstoffionenkonzentration der Probe größer ist als  $10^{-2}$  [Günzburgsche Reaktion positiv<sup>3)</sup>], ist die freie Pepsinmenge gewöhnlich groß; deshalb benutzt man dann 0,1 cm<sup>3</sup> von der Probe zur Analyse. Ist die Günzburgsche Probe negativ, so wird der größte Teil der vorhandenen Pepsinmenge gebunden sein; in diesem Fall benutzt man vorteilhaft 1,0 cm<sup>3</sup> der Probe. Die abgemessene Menge wird zu 10 cm<sup>3</sup> Edestinlösung hinzugesetzt (ergänzt durch n-Weinsäurelösung, so daß man immer mit 11 cm<sup>3</sup> Gesamtvolumen

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 155, S. 34. 1925.

<sup>2)</sup> Vgl. z. B. Ege, R.: Biochem. Zeitschr. Bd. 145, S. 66. 1924.

<sup>3)</sup> Reaktion nach Günzburg: Einige Tropfen des Günzburg-Reagens (2 Tl. Phloroglucin, 1 Tl. Vanillin auf 30 Tl. Alkohol) werden mit ebensoviel Tropfen des Mageninhalts in einer kleinen Porzellanschale über kleiner Flamme verdunstet. Es entsteht ein roter Spiegel.

arbeitet), geschüttelt und in ein Wasserbad von  $40^{\circ}$  gestellt. Nach einer halben Stunde wird das Glas für 5 Min. in kochendes Wasser gebracht, damit die Enzymspaltung unterbrochen wird, und abgekühlt. Dann wird  $1\text{ cm}^3$  Gummiarabicumlösung zugefügt und nach Ege titriert (vgl. S. 218).

b) Gesamtpepsin.  $1\text{ cm}^3$  des gut durchgeschüttelten Magensaftes nach der Probemahlzeit wird abgemessen, unter gründlichem Schütteln ein paar Minuten mit  $19\text{ cm}^3$  Phosphatlösung gemischt und unmittelbar darauf durch ein dichtes Filter filtriert. Die erste durchlaufende Menge wird verworfen. Im Filtrat findet sich sämtliches Pepsin in freiem Zustande; zu  $10\text{ cm}^3$  Edestinlösung wird  $1\text{ cm}^3$  Filtrat gegeben. Die Zeit vom Zusatz der Phosphatlösung bis zum Zusatz des Filtrats zu der sauren Edestinlösung darf keine 5—10 Min. übersteigen, da das Pepsin bei der betreffenden Reaktion nicht beständig ist.

Die Phosphatlösung besteht aus gleichen Teilen primären und sekundären Phosphats ( $p_h = 6,8$ ).

Für die Einzelheiten der Bestimmung siehe Eges Pepsinbestimmungsmethode S. 218.

#### Harn.

Zum quantitativen Pepsinnachweis im Harn kann man u. a. die Edestinprobe nach Fuld (S. 217) bzw. Ege (S. 218) anwenden, oder man bestimmt nach Hedin<sup>1)</sup> den Stickstoff einer mit der fermenthaltigen Harnlösung versetzten und danach mit Gerbsäure gefällten Caseinlösung.

Erforderliche Lösungen: 1. Harn. Der Harn wird filtriert, 3 Tage gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Das nach dem Dialysieren erhaltene Volumen wird auf  $\frac{5}{4}$  des Anfangsvolumens mit Wasser aufgefüllt. Es werden immer je  $25\text{ cm}^3$  der Lösung genommen.

2. Caseinlösung. 20 g Casein nach Hammarsten werden in  $100\text{ cm}^3$  0,1 n-NaOH und  $400\text{ cm}^3$   $\text{H}_2\text{O}$  unter Erhitzen auf dem Wasserbade gelöst. Das Volumen wird nach dem Erkalten auf  $500\text{ cm}^3$  aufgefüllt und mit Toluol versetzt.

3. Gerbsäurelösung. 100 g Gerbsäure werden in Wasser gelöst, dazu 50 g Kochsalz und 50 g Natriumacetat,  $50\text{ cm}^3$  Eisessig zugefügt und mit Wasser auf  $1000\text{ cm}^3$  aufgefüllt.

4. 0,1-n-Salzsäure.

Ausführung:  $25\text{ cm}^3$  der Harnlösung werden mit  $25\text{ cm}^3$  Caseinlösung +  $15\text{ cm}^3$  0,2-n-HCl versetzt ( $p_h$  ca. 1,6). In Gegenwart von Toluol wird 4 Tage lang bei  $37^{\circ}$  digeriert und dann

<sup>1)</sup> Hedin, S. C.: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 112, S. 252. 1921.

mit 20 cm<sup>3</sup> Gerbsäurelösung resp. bei Eiweißharnen mit 30 cm<sup>3</sup> gefällt. Nach 8—12 Std. wird filtriert, der Stickstoff in einem Teil des Filtrats bestimmt und die Analysenzahl nach Abzug des Kontrollwertes für das ganze Volumen der Flüssigkeit umgerechnet. Als Kontrolllösungen dienen 1/2 Std. auf dem Wasserbade erhitze Harnlösungen.

### Lab, Chymosin.

Als Lab wird das Ferment bezeichnet, das Milch oder calciumhaltige Caseinlösungen zur Gerinnung bringt. Zur Zeit ist die Frage nach der Identität von Pepsin und Lab, das von Hammarsten als Chymosin bezeichnet wird, noch strittig<sup>1)</sup>. Von Ivar Bang<sup>2)</sup> wurde ein Labferment von Mensch und Schwein gewonnen, das sich von dem aus Kälbermagen gewonnenen dadurch unterscheidet, daß es empfindlicher gegen Alkali ist und beständiger gegen Hitze. Er nannte es Parachymosin.

### Darstellung.

Darstellung nach Wohlgemuth<sup>3)</sup>: Zwecks Herstellung einer Lablösung können die käuflichen Präparate verwendet werden, z. B. das Labpulver von Witte. Hiervon werden 0,1 g mit 50 cm<sup>3</sup> Wasser 24 Std. unter häufigem (nicht starkem) Umschwenken im Eisschrank digeriert. Das Ungelöste wird abzentrifugiert und die klare Lösung mit dem gleichen Volumen reinsten Glycerins versetzt. Eine solche Lösung ist, in einer dunklen Flasche und im Eisschrank aufbewahrt, lange Zeit gut haltbar. Man kann auch die getrocknete Magenschleimhaut zur Herstellung wirksamer Lablösungen benutzen. Man extrahiert mit Glycerin oder verdünnter Salzsäure und neutralisiert dann.

Darstellung pepsinfreier Chymosinlösung nach Hammarsten<sup>4)</sup>. Labmägen von Saugkälbern werden vom Darm und von den drei anderen Mägen getrennt, aufgeschnitten und gründlichst gespült. Der Pylorusteil wird entfernt. Nach gründlichem Abspülen der Schleimhaut mit Leitungswasser wird die Drüschicht mit einem Uhrglas abgeschabt. Ein Teil der Drüsenmasse wird mit 10 Teilen 0,2proz. HCl 12—24 Std. bei einer etwas

<sup>1)</sup> Über die Theorien der Labwirkung vgl. Oppenheimer: Die Fermente, S. 977. Vgl. besonders Hammarsten: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 130, S. 55. 1923.

<sup>2)</sup> Bang, Ivar: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 79, S. 425. 1900.

<sup>3)</sup> Wohlgemuth: Grundriß der Fermentmethoden S. 162. Berlin 1913.

<sup>4)</sup> Hammarsten: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 56, S. 18. 1908; Bd. 74, S. 142. 1911; Bd. 94, S. 104. 1915; Bd. 121, S. 240 u. 261. 1922; Bd. 130, S. 55. 1923.

über 0° liegenden Temperatur unter häufigem Umschütteln digeriert. Danach wird filtriert, 100 cm<sup>3</sup> des Auszuges mit etwa 1 g Magnesiumcarbonat versetzt<sup>1)</sup> und einige Minuten geschüttelt. Dann wird rasch filtriert und auf Pepsin und Chymosin geprüft; die Behandlung des Filtrates mit Magnesiumcarbonat wiederholt man so lange, bis dasselbe nur noch sehr schwach auf Fibrin wirkt, dagegen kräftig Milch koaguliert. Gewöhnlich erreicht man dieses Resultat nach dreimaliger Behandlung mit Magnesiumcarbonat in weniger als 1½ Std. Koaguliert vom letzten Filtrat 1 cm<sup>3</sup> unverdünnt (oder halbverdünnt mit Wasser) bei 38° in 1 Min. eine Caseinlösung, während Fibrin nach 1 Std. zwar stark gequollen, aber sonst kaum angegriffen ist, so ist das Filtrat für die weitere Behandlung brauchbar.

Nun wird das Filtrat schwach angesäuert, mit einer Lösung von Cholesterin und Alkohol und etwas Äther rasch vermischt und kräftig geschüttelt. Man sammelt das Cholesterin auf einem Filter, wäscht mit Wasser, schlämmt das Cholesterin sehr fein in wenig Wasser auf, setzt Äther hinzu und schüttelt schwach. Die untere wässrige Lösung wird rasch von der oberen ätherischen Cholesterinlösung getrennt und in eine große flache Schale hineinfltriert, damit ein Verdunsten des Äthers erleichtert wird. Eine solche Lösung koaguliert Milch im Verhältnis 1:5 in 5 Min. oder weniger, während sie bei Gegenwart von 0,2 proz. HCl gekochtes Fibrin im Laufe von 12 Std. bei Körpertemperatur nicht merkbar verdaut.

Für Darstellung chymosinfreier Pepsinlösungen gibt Hammarsten an, daß man die saure Enzymlösung bei 40° oder einer höheren Temperatur erwärmen soll<sup>2)</sup>. Das Kälberchymosin wird hierbei rascher als das Pepsin zerstört, man erhält daher nach einiger Zeit eine Lösung, die nicht mehr labend wirkt, während sie Eiweiß verdaut.

Ein weiteres Verfahren von Hammarsten, aus Kalbsmägen Enzymlösungen mit stark aufgehobener Parallelität zwischen Pepsin und Chymosin darzustellen<sup>3)</sup>, besteht in folgendem. Die abgeschabte Drüsenschicht des Labmagens wird mit der 5fachen Menge reinem NaCl sorgfältig zerrieben und die homogene Masse in dünner Schicht auf Glasplatten gestrichen, so daß sie bei Zimmertemperatur in ca. 12 Std. trocken wird. Die harte Masse wird zu feinem Pulver zerrieben und im Exsiccator weiter getrocknet. Das Drüsen-Kochsalzpulver behandelt man mit Wasser (auf rund 40 g Pulver 100 cm<sup>3</sup>), läßt das Gemenge bis zum folgenden Tag stehen

<sup>1)</sup> Vgl. Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 56, S. 53. 1908.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 56, S. 61. 1908.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 94, S. 104. 1915.



und zentrifugiert dann. So erhält man eine kochsalzgesättigte Flüssigkeit *A* und einen aus Drüsenschlamm und etwas überschüssigem NaCl bestehenden Bodensatz *B*. Dieser Bodensatz ist noch einmal mit gesättigter NaCl-Lösung zu extrahieren. Das Ferment aus *A* zeigt sowohl Lab- wie Pepsinwirkung, aber die letztere ist sehr stark im Vergleich mit der Wirkung des aus *B* erhaltenen Fermentes, das regelmäßig sehr schwach peptisch, dagegen stark labend wirkt. Es gelingt leicht, in beiden Fällen das Ferment in fester Form auszuschcheiden, wenn man die kochsalzgesättigte Lösung mit 0,2% HCl versetzt. Man verfährt bei der Verarbeitung von *B* so, daß man in einem Glaszylinder den Bodensatz mit 0,2proz. HCl behandelt, bis die Salzsäure mit NaCl gesättigt ist. Nach einigen Stunden wird die Fällung zusammen mit dem Drüsenschlamm durch Leinwand abfiltriert und zwischen Papier ausgepreßt. Die ausgepreßte, nach dem Trocknen im Exsiccator und Zerreiben pulverige Masse (Enzymfraktion *B*) enthält die Hauptmenge der Rohenzyme.

Die kochsalzgesättigte Flüssigkeit *A* läßt man bei Zimmertemperatur in flachen Schalen eintrocknen und behandelt die Masse bei Zimmertemperatur mit 0,2proz. HCl, bis die Säure mit Kochsalz gesättigt ist und nur wenig überschüssiges NaCl ungelöst bleibt. Man erhält so eine flockige Fällung, die abzentrifugiert und dann im Exsiccator getrocknet und pulverisiert wird (Enzymfraktion *A*). Man dialysiert das mit etwas Wasser aufgeschlämmte Pulver aus *A* und *B* (auf 1 g Rohenzym mit etwa 30 cm<sup>3</sup> Wasser) 12 bis 18 Std. lang gegen 3—4mal gewechseltes Wasser, nach beendeter Dialyse verdünnt man mit mehr Wasser, bis man eine Enzymlösung von passender Wirksamkeit erhält. Oft kann man mit 100—150 cm<sup>3</sup> auf je 1 g Pulver kräftig wirkende Lösungen erhalten.

Nach dem Auslaugen und Auswaschen mit Wasser kann man den ungelösten Rückstand bei Zimmertemperatur mit 0,1proz. HCl stehen lassen (auf je 1 g Pulver etwa 100 cm<sup>3</sup> Säure) und erhält eine neue, oft kräftig wirkende Enzymlösung von Pepsin und Lab, wobei das Verhältnis der beiden Fermente wieder ein anderes ist als in der aus *B* mit Wasser erhaltenen. — Man kann die Anwendung von HCl bei dem Verfahren weglassen und das salzgesättigte Extrakt *A* direkt gegen Wasser dialysieren; in ähnlicher Weise kann man den Rückstand *B* ohne Säurezusatz nach dem Aufschlämmen in Wasser behandeln. Der obige Gang führt aber zu reineren Enzymlösungen<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Vgl. auch Hammarsten: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 74, S. 142. 1911.

Nachweis nach Michaelis und Rothstein<sup>1)</sup>.

Durch Reihenversuche wird diejenige Verdünnung der zu untersuchenden Lablösung festgestellt, die in gleicher Zeit die gleiche Wirkung zeigt wie eine bestimmte, stets reproduzierbare Einheitsfermentlösung.

Nach Michaelis ist eine Pufferung der Milch nicht nur unnötig, sondern sogar schädlich, da die Milch vermöge ihres Gehaltes an Phosphaten und Casein ein so guter Puffer ist, daß ihre  $h$  durch alle praktisch vorkommenden Fermentverdünnungen nicht meßbar geändert wird, daß aber ein Teil des Labs bei der Neutralisierung durch die geringfügigste alkalische Reaktion (beim Eintropfen) mit ungeheurer Geschwindigkeit irreversibel zerstört wird<sup>2)</sup>. Hinzukommt, daß die  $h$  der Milch in der Regel dem Optimum der Labwirkung entspricht.

Erforderliche Lösungen. 1. Fermentlösung. Irgendeine Vorbehandlung der zu untersuchenden Fermentlösung ist nicht angebracht, solange die Bedingung erfüllt ist, daß diejenige Verdünnung, die gleichzeitig mit der Kontrolle gerinnt, die Wasserstoffionenkonzentration der Milch nicht wesentlich ändert.

2. Milch. Milch wird frisch gekocht, wieder abgekühlt und mit  $\frac{1}{10}$  Volumen einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (10 g möglichst trockener Krystalle von wasserhaltigem  $\text{CaCl}_2$  auf 100  $\text{cm}^3$  Wasser) versetzt.

3. Kontrolllösung, siehe S. 220 (die Glycerinstammmlösung 10000fach zu verdünnen, d. h. die Pepsinkontrolle mit destilliertem Wasser 100fach zu verdünnen).

Ausführung: In eine Reihe von 5 Reagensgläsern werden je 2  $\text{cm}^3$  Wasser gebracht; in das erste Röhrchen kommen 2  $\text{cm}^3$  der zu untersuchenden Fermentlösung; nach Vermischen werden diesem 2  $\text{cm}^3$  entnommen und in das zweite Röhrchen gebracht usw. Jedes folgende Röhrchen enthält also die halbe Fermentmenge des vorangehenden. Nunmehr werden in ein weiteres Röhrchen 2  $\text{cm}^3$  der Kontrolllösung und dann schnell hintereinander in jedes Röhrchen 2  $\text{cm}^3$  Milch gebracht. Die Mischung wird sofort umgeschüttelt und die Gerinnung bei Zimmertemperatur beobachtet. Die Gerinnung der Kontrolle wird in der Regel zwischen die zweier benachbarter Röhrchen der Reihe fallen. Je nach dem Fermentgehalt der zu untersuchenden Lösung wird man die zweite

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 60. 1920. Vgl. auch Dtsch. med. Wochenschr. 1918, S. 685.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu Hammarsten: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 121, S. 262. 1922.

Versuchsreihe mit der unverdünnten, 10fach, 100fach oder dgl. verdünnten Lösung anfangen<sup>1)</sup>.

Der Hauptversuch besteht in einer genaueren Austitrierung. Angenommen z. B., die Gerinnung der Kontrolle sei zwischen der 100- und 200fachen Verdünnung, aber viel näher an der 100fachen erfolgt, so würde man nun etwa eine 80fache Verdünnung der zu untersuchenden Lösung herstellen. Von dieser füllt man in eine Reihe von 4 Reagensgläsern 2,0; 1,6; 1,3; 1,0 cm<sup>3</sup> und füllt die Röhren mit destilliertem Wasser alle auf 2 cm<sup>3</sup> auf. Ein fünftes Röhren wird mit 2 cm<sup>3</sup> der Kontrollfermentlösung gefüllt. Nuncmehr werden in jedes Röhren 2 cm<sup>3</sup> Milch rasch (für alle Röhren innerhalb 20—25 Sekunden) einpipettiert, und zwar in der Reihenfolge Röhren I, II, Kontrolle, III, IV. Da die Kontrolle als mittelstes Röhren eingefüllt wird, ist der zeitliche Unterschied jedes Röhrens gegen die Kontrolle im höchsten Falle 12 Sek., was in Anbetracht der gesamten Gerinnungszeit (bei nicht zu warmer Zimmertemperatur 8—10 Min.) zu vernachlässigen ist. Fällt die Gerinnungszeit der Kontrolle mit der eines Röhrens der Reihe zusammen, so ist der Fermentgehalt der zu untersuchenden Lösung gleich dem Verdünnungsgrad dieses Röhrens; fällt sie hingegen nicht zusammen, so wird die der Kontrolle gleichwertige Verdünnung durch Interpolation oder durch eine weitere, noch feiner abgestufte Verdünnungsreihe ermittelt. Die Interpolation geschieht unter Anwendung des Fuld'schen Labzeitgesetzes, nach dem das Produkt aus Fermentkonzentration und Zeit konstant ist.

Rona und Gabb<sup>2)</sup> benutzten für ihre Untersuchungen nicht Milch, sondern Trockenmilchpulver (Krause, München)<sup>3)</sup>. An jedem Versuchstage wurde durch Verreiben eine frische Lösung dieses Pulvers hergestellt, und zwar dem Gehalte der natürlichen Milch an Trockensubstanz entsprechend 12 g Pulver auf 100 cm<sup>3</sup> Wasser; die Lösung wird kurz aufgeköcht, nach dem Abkühlen filtriert. Als Regulator der [H<sup>+</sup>] dienten Acetatgemische: eine 1-n-Lösung von Natriumacetat wurde mit 1/10-n-Essigsäure in der für die gewünschte [H<sup>+</sup>] nötigen Menge versetzt und auf das doppelte Volumen aufgefüllt. Von diesem Puffergemisch wird jedem Gerinnungsversuch 1/5 des Endvolumens (10 cm<sup>3</sup>) zugefügt. Die

<sup>1)</sup> Zur Labbestimmung vgl. noch Fuld: Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 54. 1907 und Blum u. Fuld: Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 62. 1907.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 39. 1922.

<sup>3)</sup> Fuld hat bereits bei seinen Untersuchungen künstliche Milch verwendet.

Konzentration in allen Versuchen an Natriumacetat war demnach 0,1 n. Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß etwa 15 Reagensgläschen mit je 2,0 cm<sup>3</sup> Puffergemisch + 5,0 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser + 1,0 cm<sup>3</sup> Fermentlösung beschickt wurden. Als Ferment wurde Pepsin puriss. Grüber verwendet; es wurde eine 10proz. Aufschwemmung in 10proz. Kochsalzlösung angesetzt, diese nach achttägigem Stehen bei oft wiederholtem Schütteln filtriert, das Filtrat mit Glycerin zu gleichen Teilen versetzt. Die Fermentverdünnung wurde so ausgewählt, daß sie bei der gewählten „Milch“-Verdünnung bei Zusatz von 1,0 cm<sup>3</sup> CaCl<sub>2</sub> in 0,5-molarer Lösung in durchschnittlich 20 Min. zur Gerinnung führte. Dann wurde in allen Röhrchen möglichst schnell hintereinander 1,0 cm<sup>3</sup> der betreffenden Milchverdünnung zugegeben; dies geschah in weniger als 1 Min. Der Zusatz von 1,0 cm<sup>3</sup> CaCl<sub>2</sub> erfolgt sofort nach Zusatz der Milch. Das Ferment wirkte stets bei Zimmertemperatur. (Bei 40° wird das Ferment schon merklich zerstört.) — Die Umwandlung des Caseins in Paracasein ist nur vollständig bei  $p_h$  6,0—6,4.

### Trypsin.

Das Trypsin spaltet die Eiweißkörper bei alkalischer Reaktion, wie man bis zu den Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz annahm, bis zu den Aminosäuren<sup>1)</sup>.

In der Bauchspeicheldrüse findet sich das Ferment als Proferment. Die frische Pankreasdrüse sowie ihr reines Sekret besitzen keine tryptische Aktivität gegenüber genuinen Proteinen. Das Ferment wird durch einen Aktivator — nichtfermentativer Natur — die Enterokinase, aktiviert. Außerdem ist eine spontane Aktivierung des Trypsins bei der Aufbewahrung der Pankreasdrüse zu beobachten. Es handelt sich hierbei um die Bildung eines Aktivators aus der Drüsensubstanz, der in seinem Verhalten mit der Enterokinase weitgehend übereinstimmt<sup>2)</sup>. Durch Calcium und durch andere Erdalkalisalze allein ist eine Aktivierung nicht zu bewerkstelligen.

<sup>1)</sup> Vgl. hierzu S. 212.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 181. 1923; Bd. 142, S. 217. 1925. Vgl. auch Waldschmidt-Leitz u. A. Harteneck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 149, S. 224. 1925. „Man gewinnt eine Vorstellung von dem Vorgang der Trypsinaktivierung im tierischen Organismus und eine Erklärung für die Anwesenheit der Enterokinase und des Erepins in dem Darmsekret, wenn man annimmt, daß die Pankreasdrüse, die ja das Trypsin zum Schutze gegen die Selbstauflösung in nichtaktiver Form ausbildet, mit diesem zugleich die gesamte, zu seiner Aktivierung nötige Menge

## Darstellung.

Darstellung nach Michaelis<sup>1)</sup>. Ein relativ reines Trypsinpräparat gewinnt man, wenn man irgendein käufliches Trypsinpräparat, z. B. Trypsinum puriss. Rhenania, mittels milchsaurem Natrium und Milchsäure ausflockt. Man versetzt 100 cm<sup>3</sup> einer 2proz. filtrierten Lösung des Präparates mit 10 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$ -n-milchsaurem Natrium und 10 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$ -n-Milchsäure. Der dabei entstehende Niederschlag wird am nächsten Tage abzentrifugiert. Er enthält den größten Teil des vorhandenen Trypsins, dagegen nur verschwindend wenig von den vorhandenen Eiweiß- und eiweißartigen Körpern. Das Koagulationsoptimum des aus Pankreasextrakten fällbaren  $\alpha$ -Nucleoproteids und die isoelektrische Reaktion des Trypsins liegen praktisch bei derselben Wasserstoffionenkonzentration, und das ausgefällte  $\alpha$ -Nucleoproteid adsorbiert fast das gesamte Trypsin der Lösung.

Darstellung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz<sup>2)</sup>. Mehrere Kilogramm frisches Schweinepankreas werden sauber präpariert und 4—5 mal durch eine Fleischhackmaschine getrieben. Der dünne Brei wird in Reibschalen unter mehrmaligem Zugeben von Aceton verrieben, bis man ungefähr die 5—6 fache Menge Aceton zur Drüsensubstanz gesetzt hat. Die Aufschwemmung wird portionsweise in Flaschen gut durchgeschüttelt. Nach 1—2stündigem Stehen wird filtriert, der Filtrierückstand von neuem durch Schütteln in den Flaschen und Filtrieren wie zuvor mit derselben Menge Aceton, darauf mit der halben Menge Aceton und der halben Menge Äther und schließlich zweimal mit je der doppelten Menge Äther gewaschen. Das nun körnige und pulverige Material wird zerrieben, in dünner Schicht zwischen Filtrierpapier ausgebreitet und an der Luft getrocknet. Das noch stark mit Fasersubstanz durchsetzte Pulver wird in einer Schlagmühle aufs feinste gemahlen und durch ein feinmaschiges Sieb geschüttelt; mit dem

---

der Enterokinase in unfertigem Zustande an das Sekret abgibt. Die Umwandlung der Aktivatorvorstufe in das fertige Produkt würde sich dann unter Mitwirkung des ereptischen Enzyms nach adsorptiver Aufnahme beider in den Zellen der Darmschleimhaut vollziehen und die beiden Stoffe, Erepzin und Enterokinase, die sich in der Schleimhaut angehäuft finden, könnten sie wiederum als Sekretionsprodukt verlassen, wengleich sie ihre eigentliche Entstehung der Pankreasdrüse verdanken.“

<sup>1)</sup> Michaelis L.: und H. Davidsohn: Biochem. Zeitschr. Bd. 144, S. 294. 1924. Vgl. auch Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 481, 1910.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 132 (u. 150). 1923; Bd. 126, S. 143. 1922; Bd. 142, S. 217. 1924.

Siebrückstand muß das Mahlen und Sieben öfters wiederholt werden. Der feine Anteil enthält die Hauptmenge der Drüsen- substanz. Der grobfaserige Anteil enthält auch noch beträcht- liche Mengen an Drüsensubstanz, deren Ablösung mit mechani- schen Mitteln aber nicht mehr gelingt. Die Ausbeute an ent- fetteten trockenen Drüsen beträgt fast  $\frac{1}{5}$  der gereinigten frischen und die Ausbeute an feinem Drüsenpulver  $\frac{2}{3}$  des ganzen Trocken- pankreas.

Die getrocknete Drüse liefert mit reinem oder wasserhaltigem Glycerin klare, an Lipase, Amylase und Trypsin reiche Lösungen. Zur Trennung dieser 3 Fermente behandelt man einen Teil des feinkörnigen Pulvers mit der 16fachen Menge 87proz. Glycerins 4—8 Std. lang bei 30°. Den Auszug filtriert man entweder unter geringem Saugen auf der Nutsche durch ein doppeltes Filter (unten Koliertuch, oben Filtrierpapier), oder man trennt zweckmäßiger den Glycerinextrakt von der Hauptmenge der ungelösten Drüsen- substanz durch Zentrifugieren bei hoher Tourenzahl (eine halbe Stunde bei 6000 Touren). Der Rückstand wird noch wiederholt mit Glycerin ausgezogen. Der noch stark getrübe Glycerinextrakt (Rohextrakt) wird durch Zusatz der 5fachen Menge Wasser und nochmaliges Zentrifugieren geklärt. Es empfiehlt sich, diese Klärung unmittelbar vor der weiteren Verarbeitung vorzunehmen, da der wässrige Auszug wenig haltbar ist, während der Rohextrakt sich sehr lange hält. Die Amylase wird der getrockneten Drüse durch Glycerin wie durch Wasser leicht entzogen, Trypsin wird hingegen schwerer als die Lipase aufgenommen. In den Glycerin- lösungen findet man nur etwa die halbe tryptische Wirkung wie in der getrockneten Pankreasdrüse.

Aus den Glycerinauszügen läßt sich die Lipase durch Alumi- niumhydroxyd und durch Kaolin leicht adsorbieren. Zu diesem Zwecke macht man die Lösung essigsauer und versetzt sie mit Aluminiumhydroxyd, das durch Fällen von Aluminiumsulfat mit Ammoniak und darauffolgendem kurzem Aufkochen dargestellt wird (Sorte B, vgl. S. 141).

Bei der ersten Adsorption sind in der sauer reagierenden Rest- lösung mit einem kleinen Teil der Lipase diastatisches und proteo- lytisches Enzym zurückgeblieben. Es bedarf nur einer Wieder- holung des Adsorptions- und Elutionsprozesses, um Amylase und Trypsin vollkommen von Lipase zu befreien.

Aus der Lösung, die Trypsin und Amylase enthält, adsorbiert man das Trypsin mittels elektrosmotisch oder mit HCl gereinigtem Kaolin. Die Begleitstoffe bewirken, daß bei der ersten Einwirkung von Kaolin ein Teil der Amylase in das Adsorbens übergeht. Aber

dabei verarmt die Fermentlösung an den die Adsorption störenden Beimischungen. Dann läßt sich die Bindung durch Kaolin vervollständigen ohne weiteres Mitwandern der Amylase. Die Trennung von Amylase und Trypsin läßt sich demnach durch zweimalige Einwirkung von Kaolin auf die schwach essigsäure (von Alkohol freie) Lösung durchführen, wobei sich die Verluste an Amylase gewöhnlich zwischen 20—40 % bewegen. Aus den dabei erhaltenen Kaolinadsorbaten läßt sich das Trypsin frei von Amylase mittels ammoniakalischen Phosphats (100 cm<sup>3</sup> 0,6 proz. 2<sup>1</sup>/<sub>3</sub> bas. Ammonphosphat) eluieren.

Beispiel<sup>1)</sup>: Angewandt wurde eine von Lipase befreite Enzymlösung. 200 cm<sup>3</sup> dieser Lösung wurden mit 2,3 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure angesäuert und mit der Suspension von 4,8 g elektroosmotisch gereinigtem Kaolin in 20 cm<sup>3</sup> Wasser geschüttelt, mittels Zentrifuge 210 cm<sup>3</sup> Restlösung abgetrennt. Die Behandlung mit Kaolin wird wiederholt. Aus den Kaolinadsorbaten läßt sich das Trypsin mit ammoniakalischem Phosphat freilegen. — Wegen der gegenüber Kaolin empfindlichem Amylase ist es ratsam, die Operation mit kleinen Mengen und so rasch wie möglich auszuführen. Am schonendsten wirkt das nach Willstätter und Racke<sup>2)</sup> mit HCl ausgekochte und durch gründliches Auswaschen von Säure befreite Kaolin (vgl. S. 142).

#### Nachweis und Bestimmung.

Zur oberflächlich orientierenden Prüfung kann man eine der älteren Methoden [Auflösung einer mit Kongorot oder Spritblau<sup>3)</sup> gefärbten Fibrinflocke] in entsprechend alkalischer Lösung anwenden. Fast alle unter Pepsin angeführten Methoden sind mit entsprechender Änderung des  $p_h$  auf Trypsin übertragbar. Eine solche, auch schon bei Pepsin abgehandelte modifizierte Methode ist z. B. auch die von Groß<sup>4)</sup>, von Fuld<sup>5)</sup> und von Michaelis<sup>4)</sup> beschriebene. Die Methode beruht auf dem Prinzip, daß aus einer dünnen Caseinlösung (0,1 % in 1 proz. Sodalösung) das unveränderte Casein durch 1 proz. Essigsäure ausgefällt wird. Man bestimmt entweder die Zeit, welche vergeht, bis eine der

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 126, S. 164. 1923.

<sup>2)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 86. 1920/21.

<sup>3)</sup> Vgl. Smorodinzew und Adowa Biochem. Zeitschr. Bd. 153, S. 14. 1924.

<sup>4)</sup> Groß: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 58, S. 157. 1908. — Fuld: Ebenda Bd. 58, S. 468. 1908. — Michaelis: Biochem. Zeitschr. Bd. 10, S. 290. 1908.

<sup>5)</sup> Fuld, v. Bergmann u. K. Meyer: Berlin. klin. Wochenschr. 1908, S. 1673.

Trypsinverdauung unterworfenen Caseinlösung durch Essigsäure nicht mehr getrübt wird, oder man bestimmt die Fermentverdünnung, bei der bei konstanter Zeit die Trübung ausbleibt.

Erforderliche Lösungen. 1. 1 prom. Caseinlösung. 0,1 g Casein (Hammarsten) wird in einem 200 cm<sup>3</sup> fassenden Becherglas mit 5 cm<sup>3</sup> 1/10-n-NaOH und 25 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser versetzt, und auf dem Drahtnetz zum Sieden erhitzt. Nach einmaligem Aufkochen wird das Becherglas in einem Gefäß mit kaltem Wasser gekühlt und die überschüssige Lauge mit 1/10-n-HCl neutralisiert. (Hierzu sind etwa 4,5 cm<sup>3</sup> nötig.) Die Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. — Oder man löst 0,1 g Casein in 100 cm<sup>3</sup> 0,1 proz. Sodalösung unter Erwärmen.

2. Essigsäure, alkoholische Lösung. (1 Teil Essigsäure, 49 Teile Wasser, 50 Teile 96 proz. Alkohol.)

Ausführung: 10 Reagensgläser werden mit absteigenden Mengen der zu untersuchenden Fermentlösung beschickt, wobei die Verdünnungen mit destilliertem Wasser hergestellt werden. Sodann werden zu jedem Gläschen 2 cm<sup>3</sup> der 1 prom. Caseinlösung zugesetzt, sämtliche Gläschen für 1 Std. bei 38° gehalten, und nach dem Abkühlen zu jeder Portion 6 Tropfen\* der essigsauren alkoholischen Lösung zugefügt. Das unterste, noch völlig klare Gläschen dient zur Berechnung der Trypsinmenge.

Bei der Berechnung der Wirkung wird festgestellt, wieviel Kubikzentimeter der Caseinlösung von 1,0 cm<sup>3</sup> der untersuchten Fermentlösung innerhalb der Beobachtungszeit verdaut worden wären.

#### Methode von Palitzsch und Walbum<sup>1)</sup> (Modifikation der Methode von Fermi).

Prinzip: Sie benützt als Maß den Grad der Verflüssigung von Gelatine durch Trypsin.

Gelatinelösung: 1400 g gute Gelatine werden in ca. 2,5 l lauwarmen Wassers gelöst und die zähe Flüssigkeit durch ein Sieb gegossen; dazu gibt man ca. 2 g Thymol und 25 cm<sup>3</sup> ca. 5 n-Natriumhydroxydlösung. Die Lösung wird auf 4000 cm<sup>3</sup> aufgefüllt, in 200-cm<sup>3</sup>-Flaschen gefüllt und im Eisschrank aufbewahrt. (100 g der von diesen Autoren benutzten Gelatinelösung mit 625 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt hatten einen  $p_h = 5,8$ .) Zum Versuch werden kurz vorher 200 g dieser 35 proz. Lösung abgewogen und mit Wasser, in dem 15,5 g reine Borsäure als Puffer gelöst sind,

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 47, S. 1. 1912. Fermi: Arch. f. Hygiene Bd. 12, S. 242, 1891 und Bd. 55, S. 142, 1906.



auf 1 l aufgefüllt. In den Versuchen werden 40 cm<sup>3</sup> dieser Lösung zu 50 cm<sup>3</sup> verdünt.

Ausführung: Man füllt in 100 cm<sup>3</sup> Kjeldahlkolben je 40 cm<sup>3</sup> der borsäurehaltigen Gelatinelösung. Dazu setzt man soviel n-NaOH, daß die Kolben eine bestimmte und gleiche [H<sup>+</sup>] haben, insgesamt 8 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit. Die Kolben werden ca. 20 Min. im Thermostaten von 30° gewärmt, worauf man 2 cm<sup>3</sup> der verdünnten (nicht vorgewärmten) Trypsinlösung zusetzt und gut schüttelt. Nach Ablauf bestimmter Zeiten werden den Kolben je 5 cm<sup>3</sup> entnommen und in Reagensgläser (Durchmesser 21—22 mm) eingefüllt, die in 1 cm<sup>3</sup> Wasser eine zur genauen Neutralisation der zugefügten NaOH ausreichende Menge n-HCl enthalten und die vorher 10 Min. in einer Mischung von Eis und Wasser standen. Nach gutem Durchmischen wird die neutralisierte Gelatinemischung 15 Min. lang ohne Schütteln abgekühlt, wonach die Konsistenz beurteilt wird. Es werden von den Verfassern 12 Grade der Verflüssigung unterschieden.

0 bedeutet vollständig starr; der Gelatineklumpen wird selbst durch kräftiges Schütteln nicht losgemacht.

1 bedeutet starr; durch starkes Schütteln kann ein wenig losgelöst werden.

2 bedeutet starr; wird leichter zerrissen.

3 bedeutet starr; die Oberfläche bewegt sich beim Schütteln.

4 bedeutet: wird leicht zerrissen.

5 bedeutet beinahe weich.

6 bedeutet weich.

7 bedeutet sehr weich.

8 bedeutet: beinahe halbflüssig.

9 bedeutet halbflüssig.

10 bedeutet dickflüssig.

11 bedeutet beinahe flüssig.

12 bedeutet dünnflüssig.

#### Bestimmung nach Northrop<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die fortschreitende Hydrolyse der Eiweißkörper wird an der Änderung der Leitfähigkeit einer Gelatinelösung (hergestellt nach Loeb) verfolgt<sup>2)</sup>.

Gelatine nach Loeb<sup>3)</sup>. 50 g feinpulverisierter guter Gelatine,

<sup>1)</sup> Northrop: Journ. of gen. physiol. Bd. 4, S. 227.

<sup>2)</sup> Vgl. Henri, V. u. des Bancel: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 55, S. 563, 787, 788. 1903 und Bayliss W. M.: Arch. de biol. Bd. 11, Suppl. 261. 1904.

<sup>3)</sup> Loeb, J.: Die Eiweißkörper. S. 39. Berlin, Julius Springer. 1924.

deren  $p_h$  etwa zwischen 6,0 und 7,0 liegt, werden in 3 l einer m/128 Essigsäure von 10° eingetragen und häufig umgerührt. Nach halbstündigem Stehen wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen und frische m/128-Essigsäure von 10° bis zum ursprünglichen Volumen zugesetzt. Dann wird wieder gerührt, nach 30 Min. wieder dekantiert und die abgegossene Säuremenge durch das gleiche Volumen destillierten Wassers von 5° ersetzt. Nach gutem Umrühren wird die Gelatine abgenutscht und auf der Nutsche 5mal mit je 1 l Wasser von 5° gewaschen. Dann wird der Gelatine in ein großes Becherglas gebracht und auf dem Wasserbad auf etwa 50° erhitzt, wobei die Gelatine sich löst.

Erforderliche Lösungen. 1. Gelatinelösung: Die nach Loeb bereitete Gelatine (siehe oben) wird gewaschen, geschmolzen auf einen Prozentgehalt von 5% Gelatine gebracht und mit NaOH zu einem  $p_h$  von 6,3 titriert. Die Lösung wird bis zu einem Trockengewicht von 2,5 g auf 100 cm<sup>3</sup> verdünnt und genügend KCl zugefügt, so daß die Lösung eine spezifische Leitfähigkeit von  $2 \cdot 10^{-3}$  reziproken Ohm bei 33° hatte. Nach Zusatz einiger kleiner Thymolkrystalle wird die Lösung im Eisschrank aufbewahrt.

2. Trypsin. Von einem käuflichen Trypsinpräparat (Northrop benutzte Trypsin „Fairchild“) werden 5 g in 50 cm<sup>3</sup> Wasser aufgelöst und bei 6° 18 Std. dialysiert. Der filtrierten Lösung wird soviel KCl zugesetzt, daß die spezifische Leitfähigkeit  $2 \cdot 10^{-3}$  beträgt. Die Lösung muß jeden Tag frisch bereitet werden, da sie ihre Wirksamkeit sehr schnell verliert.

Bestimmung der Leitfähigkeit. Der von Northrop benutzte Apparat besteht aus einer Kohlräuschbrücke und einem Widerstandskasten. Die Resultate bei der Brückenablesung werden direkt ohne weitere Ausrechnung benutzt. Diese Resultate stehen zu der tatsächlichen Leitfähigkeit in Beziehung durch die Formel

$$X = \frac{A}{1000 - A} R,$$

in welcher  $X$  der Widerstand der Lösung,  $A$  die Brückenablesung und  $R$  der Widerstand des Widerstandskastens ist. Wenn die Ablesungen immer in der Mitte des Kastens begonnen werden (bei 500), repräsentieren die ersten 10 oder 15 Brückenpunkte beinahe gleiche Änderungen der Leitfähigkeit und können als proportional

der prozentualen Änderung der Leitfähigkeit betrachtet werden. Da alle Lösungen dieselbe Leitfähigkeit zu Beginn des Experimentes haben und der Widerstand so gewählt werden kann, daß die Brückenablesung im Beginn 500 in jedem Falle beträgt, wird die Änderung in der Brückenablesung von 500 zu 490 dieselbe Änderung in der Leitfähigkeit jeder der verschiedenen Lösungen bedeuten.

Leitfähigkeitsgefäß. Die Abb. 63 zeigt das benutzte Gefäß, von dem man sich eine Anzahl herstellt. Das Gefäß ist ein Jenenser Reagensglas (Northrop benutzt „Pyrex“-Glas) von ca. 40 cm<sup>3</sup> Inhalt und 20 mm Durchmesser.

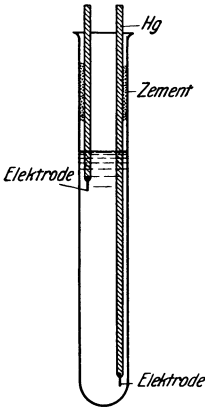


Abb. 63.

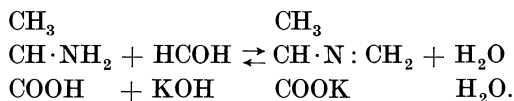
Die Elektroden bestehen aus Platindraht, sind in dünne „Pyrex“- oder Jena-Glasröhren eingeschmolzen, und an ihren 5 mm langen freien Enden mit Platinschwarz überzogen. Die Glasröhren, die die Elektroden tragen, werden mit Siegellack an den Seiten des Reagensglases befestigt und danach mit Quecksilber gefüllt. Die Entfernung zwischen den Elektroden wird so gewählt, daß alle Gläser dieselbe Konstante haben, d. h. daß sie alle dieselbe Ablesung zeigen, wenn sie mit derselben Lösung gefüllt sind. Die Einstellung auf die Konstante 3,5 erreicht man so, daß man den Siegellack erwärmt und dann die Elektroden entfernt oder nähert.

Ausführung der Bestimmung. Von der Gelatinelösung werden je 25 cm<sup>3</sup> in eine Reihe der Reagensgläser pipettiert und diese im Wasserbad bei  $33^{\circ} \pm 0,01^{\circ}$  gehalten. Die Leitfähigkeit wird von Zeit zu Zeit bestimmt, bis sie konstant ist (gewöhnlich innerhalb 20 Min.). 1 cm<sup>3</sup> der Trypsinlösung, die vorher auf  $33^{\circ}$  und auf dieselbe Leitfähigkeit gebracht wurde, wird unter sorgfältigem Mischen hinzugefügt. Bei einem  $p_h$  von 6,2—6,4 der Lösung braucht man keinen Puffer, da dann bei der Verdauung der Gelatine keine Änderung des  $p_h$  eintritt. Die Lösung wird durch Aufsaugen und Zurückfließenlassen mit einer warmen, trockenen Pipette dreimal gut durchgemischt, wobei Luftblasen zu vermeiden sind. Unregelmäßige Resultate kann man fast immer auf schlechtes Mischen zurückführen. Die Leitfähigkeit der Lösung wird in bestimmten Zwischenräumen abgelesen, so daß auf je 1,5 oder 2 Teilstrecken auf der Brücke eine Ablesung erfolgt, bis die Ablesung 485 oder weniger beträgt. Die Zeit wird von dem Punkt gerechnet, an dem das Trypsin zugefügt wurde. Es ist

zweckmäßig, eine Uhr mit einer Hundertstel-Stundeneinteilung zu benutzen an Stelle einer gewöhnlichen. Wenn eine Trypsinlösung von der gleichen Temperatur und Leitfähigkeit wie die Gelatinelösung hinzugefügt und die Mischung ohne Temperaturschwankungen und ohne Luftblasen gehalten wurde, folgen die Ablesungen einer stetigen Kurve. Wenn die erste Ablesung nicht in dieselbe Kurve wie die folgenden fällt, wird die Kurve, um den Nullpunkt zu finden, extrapoliert. Die Zeit, die notwendig ist, um 10 Punkte zu bestimmen, wird durch Interpolation gefunden. Das entspricht einer Leitfähigkeitsänderung von  $0,0782 \times 10^{-3}$  reziproken Ohm und ist weniger als 10% der totalen Spaltung, die durch Trypsin unter diesen Bedingungen bewerkstelligt werden kann.

Bestimmung mit der Formoltitration nach Sörensen<sup>1)</sup>.

Bei der Proteolyse kommt es hauptsächlich zur hydrolytischen Lösung amidartiger Bindungen unter Wasseraufnahme und zur Bildung von Carboxyl- und Aminogruppen. Sörensen hat durch Formolzusatz die vorhandenen bzw. gebildeten Aminogruppen neutralisiert und dadurch die Carboxylgruppe allein der Titration zugänglich gemacht. Der Vorgang verläuft nach der Gleichung:



Die Differenz zwischen denjenigen Säuremengen, die zu zwei verschiedenen Zeitpunkten in irgendeiner in Verdauung begriffenen Flüssigkeit nach Formolzusatz titrierbar sind, wird somit ein Maß für die in dem betreffenden Intervall gelösten Peptidverbindungen abgeben. Die Wasserstoffionenkonzentration, bei der die Neutralisation der Aminosäuren durch KOH zu Ende verläuft, liegt bei  $p_h = 9$  bis 9,5. Ein brauchbarer Indicator ist Phenolphthalein, wenn zur stark roten Farbe titriert wird, oder noch besser Thymolphthalein.

Fehlerquellen. Das Resultat wird fehlerhaft bei reichlicher Gegenwart von  $\alpha$ -Prolin und Tyrosin, was bei den gewöhnlichen Proteinstoffen nicht der Fall ist. Harnstoff und Guanidinsalze (ebenso wie Arginin) verhalten sich auch nach

<sup>1)</sup> Sörensen: Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 45. 1908. — Dargestellt nach Jessen-Hansen: Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7, Heft 1, S. 245.

Formolzusatz wie völlig neutrale Stoffe. Sind größere Mengen Ammoniak anwesend, so muß das Ammoniak vorher durch Destillation mit Baryt unter stark vermindertem Druck entfernt werden. Die Eigenfarben der Lösungen sind ferner hinderlich bei der Wahrnehmung des Endpunktes der Titration. Man kann dann der Kontrolllösung einen Farbton geben, der dem der zu titrierenden Lösung ähnlich ist (einige Tropfen einer Lösung von 0,2 g Tropäolin 0 oder Tropäolin 00 oder Bismarckbraun, alle in Lösungen von 0,2 g in 1 l Wasser). Wenn es sich um Säurespaltungsprodukte handelt, muß man die Lösung entfärben, wie unten gezeigt wird.

Erforderliche Lösungen. 1. Eine  $n/5$ -Lösung von Natriumhydroxyd [oder Bariumhydroxyd]<sup>1)</sup>.

2. Eine  $n/5$ -Lösung von Salzsäure.

3. Eine Lösung von 0,5 g Phenolphthalein in 50 cm<sup>3</sup> Alkohol und 50 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O.

4. Eine Formollösung, die für jeden Versuch frisch hergestellt werden muß. 50 cm<sup>3</sup> käufliches, 30—40 proz. Formaldehyd werden mit 1 cm<sup>3</sup> Phenolphthaleinlösung und danach mit  $n/5$ -Lauge bis zum ganz schwachen rosa Farbton versetzt.

5. Eine Eiweißlösung, z. B. eine 4 proz. Lösung von Wittepepton.

6. Eine Pepsin- oder Trypsinlösung.

Die Vorbereitung der zu untersuchenden Lösung besteht, falls keine Phosphor- oder Kohlensäure vorhanden ist, in einer möglichst genauen Einstellung auf die schwach saure Reaktion gegen Lackmuspapier. (Eine Vergleichsflüssigkeit, bestehend aus gleichen Teilen  $1/15$  m primärem Kaliumphosphat und  $1/15$  m sekundärem Natriumphosphat hat den erwünschten  $p_h$  von 6,8.) Sind Phosphor- und Kohlensäure vorhanden, so werden zu ihrer Entfernung 50 cm<sup>3</sup> der zu analysierenden Lösung in einen 100-cm<sup>3</sup>-Meßkolben pipettiert und mit 1 cm<sup>3</sup> Phenolphthaleinlösung (0,5 proz. alkoholisch-wässrige Lösung) und mit 2 g festem Bariumchlorid versetzt. Dann wird von einer gesättigten Lösung von Bariumhydroxyd zunächst bis zur roten Farbe, und dann noch weitere 5 cm<sup>3</sup> zugegeben. Nach Auffüllen mit Wasser bis zur Marke, gutem Umschütteln und viertelstündigem Stehen wird durch ein trockenes Filter filtriert. 80 cm<sup>3</sup> des Filtrates (A) werden in einem 100 cm<sup>3</sup>-Meßkolben mit  $1/5$  n-HCl gegen Lackmuspapier neutralisiert und darauf mit ausgekochtem Wasser bis

<sup>1)</sup> Vgl. hierzu Sörensen, S. P. L.: Biochem. Zeitschr. Bd. 25, S. 1. 1901.

auf 100 cm<sup>3</sup> verdünnt. In gleich großen Teilen der neutralisierten Flüssigkeit bestimmt man teils das Ammoniak, teils die formoltitrierbare N-Menge. Ist viel Ammoniak vorhanden, so wird dieses aus dem klaren, roten Filtrat *A* im Vakuum abdestilliert (vgl. S. 251), der Destillationsrückstand in einigen cm<sup>3</sup> n-HCl gelöst, durch den Kolben CO<sub>2</sub>-freie Luft durchgesogen (um eine eventuelle Spur von Kohlensäure auszutreiben), und dann die salzsaure Lösung in einem 100-cm<sup>3</sup>-Meßkolben gegen Lackmuspapier neutralisiert, schließlich mit CO<sub>2</sub>-freiem Wasser bis zur Marke nachgefüllt und in einer passenden Menge (z. B. 40 cm<sup>3</sup> entsprechend 16 cm<sup>3</sup> der ursprünglichen Flüssigkeit) die Formoltitrierung ausgeführt.

**Ausführung. Entfärbung.** Ist die Entfärbung notwendig und liegt eine passend saure Flüssigkeit vor (d. h. in bezug auf den Säuregehalt ungefähr  $\frac{1}{10}$ -n), so werden 25 cm<sup>3</sup> derselben in einen 50-cm<sup>3</sup>-Meßkolben gebracht. Ist die vorliegende Lösung nicht passend sauer, nimmt man nur 20 cm<sup>3</sup>, und es werden je nach den Umständen z. B. 5 cm<sup>3</sup> n/2-Salzsäure bzw. Natronlauge zugesetzt. Danach werden ca. 4 cm<sup>3</sup> 2 n-Bariumchloridlösung (244 g BaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O in 1 l Lösung) zugesetzt und nach und nach unter gutem und häufigem Schütteln (die letzten Male muß der Kolben während des Schüttelns geschlossen sein) 20 cm<sup>3</sup> ca. 1/3-n-Silbernitratlösung (56,7 g reines AgNO<sub>3</sub> in 1 l), am besten aus einem kleinen Meßzylinder zugetröpfelt. Wenn der gebildete Schaum nach kurzem Stehen sich gesetzt hat, wird kohlenstofffreies Wasser bis zur Marke zugesetzt und überdies dem gebildeten Silberchlorid entsprechend noch 4 Tropfen Wasser. Nach gutem Umschütteln wird durch ein gewöhnliches 11 cm-Filter filtriert, indem man möglichst viel von dem Niederschlag auf das Filter bringt. Das im Anfang trübe Filtrat wird vorsichtig wieder auf das Filter gegossen. Mit einer passenden Menge (15—30 cm<sup>3</sup>) des völlig klaren Filtrats wird dann nach vorherigem Neutralisieren gegen Lackmuspapier die Formoltitration ausgeführt.

**Die Titration:** Man führt die Titration in 20 cm<sup>3</sup> oder auch etwas mehr (wenn wenig formoltitrierbarer Stickstoff vorhanden ist) aus.

Um den Endpunkt der Titration scharf zu erkennen und um den Einfluß der Formollösung zu eliminieren, benutzt man eine Kontrollösung, welche folgendermaßen herzustellen ist: Zu 20 cm<sup>3</sup> oder, wenn für die Analyse ein anderes Volumen benutzt wird, einem entsprechenden Volumen ausgekochten, destillierten Wassers werden zuerst 10 cm<sup>3</sup> der Formolmischung und danach ungefähr halb soviel NaOH wie bei der eigentlichen Bestimmung zu verwenden

ist, zugesetzt. Dann wird mit  $n/5$ -Salzsäure zurücktitriert, bis die Flüssigkeit nach gutem Schütteln eben einen schwach rosa Farbton zeigt ( $p_h = 8,3$ , erstes Stadium der Titration) und jetzt ein Tropfen  $n/5$ -Lauge zugegeben, wodurch die Flüssigkeit deutlich rote Farbe annimmt ( $p_h = 8,8$ , zweites Stadium der Titration).

Die zur Untersuchung vorliegenden Lösungen werden bis zu dieser letzten Farbenstärke titriert, indem  $10\text{ cm}^3$  der Formolmischung zu  $20\text{ cm}^3$  der Analyse zugesetzt werden und gleich darauf  $n/5$ -Lauge, bis die Färbung stärker als die der Kontrolllösung erscheint; dann wieder  $n/5$ -Salzsäure, bis die Färbung schwächer als die der Kontrolllösung geworden ist, und schließlich wird Lauge zugetropft, bis die Farbstärke der Kontrolllösung ganz erreicht ist.

Wenn alle vorliegenden Lösungen auf diese Weise titriert worden sind (Phenolphthalein, zweites Stadium), werden der Kontrolllösung weiter 2 Tropfen zugefügt, wodurch sie eine stark rote Farbe annimmt ( $p_h = 9,1$ , drittes Stadium). Die Titration wird dann beendet, indem jeder Lösung Lauge zugetropft wird, bis die stark rote Farbe der Kontrolllösung erreicht worden ist. Selbstverständlich kann man auch sofort bis zum dritten Stadium titrieren.

**Titration mit Thymolphthalein.** Wendet man statt des Phenolphthaleins Thymolphthalein als Indicator an, dann ist statt der oben unter 3. und 4. aufgeführten Flüssigkeiten zu benutzen:

1. Eine Lösung von 0,5 g Thymolphthalein (Grübler) in 1 l 93 proz. Alkohol und

2. eine Formolmischung, die jedesmal folgendermaßen frisch zu bereiten ist: Zu  $50\text{ cm}^3$  Handelsformol werden  $25\text{ cm}^3$  absoluter Alkohol,  $5\text{ cm}^3$  Thymolphthaleinlösung und schließlich  $n/5$ -Lauge bis zum schwach grünlichen oder bläulichen Farbton zugefügt.

Als Kontrolllösung werden auch hier  $20\text{ cm}^3$  ausgekochtes Wasser verwendet. Es werden zuerst  $15\text{ cm}^3$  der Formolmischung und etwa die halbe Menge Lauge, wie die bei den Bestimmungen verwendete, zugesetzt; dann wird mit  $n/5$ -Salzsäure zurücktitriert, bis die Lösung bläulich opalisierend erscheint. Jetzt werden 2 Tropfen Lauge zugegeben, die der Flüssigkeit eine schöne und blaue Farbe erteilen ( $p_h = 9,45$ ).

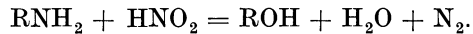
Bis zu dieser letzten Farbenstärke werden die Lösungen titriert, indem  $20\text{ cm}^3$  der zu untersuchenden Lösung,  $15\text{ cm}^3$  Formolmischung und gleich darauf ein kleiner Überschuß an Lauge zugesetzt werden. Nach Zurücktitration mit Salzsäure, wobei die Farbe





Methode nach van Slyke<sup>1)</sup>.

Die Aminosäuren und Polypeptide reagieren mit salpetriger Säure nach folgender Gleichung



Der gebildete Stickstoff wird gasvolumetrisch gemessen. Den Umfang einer Proteolyse mißt man so, daß man zunächst das Substrat mittels HCl vollständig hydrolysiert und den mit salpetriger Säure reagierenden Stickstoff dieses Gemisches bestimmt; dann läßt man das Ferment auf eine entsprechende Menge des Eiweißsubstrats eine bestimmte Zeit lang einwirken. Aus der Differenz zwischen dem Stickstoff des Säurehydrolysen-gemisches und dem N, der nach der Spaltung durch das Ferment mit HNO<sub>2</sub> gebildet wird, ist die Größe der Verdauung ersichtlich. Proteine reagieren nur mit einer Spur ihres Stickstoffgehaltes.

Die salpetrige Säure zersetzt sich in stark essigsaurer Lösung von selbst unter Bildung von Stickoxyd. Diese Reaktion wird bei der Methode benutzt, um die Luft aus dem Apparat mittels Stickoxydes zu verdrängen. Das Oxyd wird dann durch alkalische Permanganatlösung in der Hempelschen Bürette absorbiert.

Erforderliche Lösungen. 1. Eiweißlösung: z. B. eine Edestinlösung, 6 g Edestin auf 150 cm<sup>3</sup> Wasser.

2. Pepsin- oder Trypsinlösung.

3. Kaliumpermanganatlösung. 50 g KMnO<sub>4</sub> und 25 g KOH im Liter. Die Lösung kann öfter gebraucht werden. (Das Verbindungsrohr zur Hempelschen Bürette ist während des Nichtgebrauches mit Wasser, nicht mit der alkalischen Permanganatlösung stehen zu lassen!)

4. Natriumnitrit. 30 g NaNO<sub>2</sub> in 100 cm<sup>3</sup> Wasser. Das käufliche NaNO<sub>2</sub> enthält oft Verunreinigungen, die Stickstoff entwickeln. Deshalb muß das NaNO<sub>2</sub> immer, bevor es gebraucht wird, geprüft werden und, wenn nötig, eine Korrektur für das Reagens angebracht werden. Handelt es sich darum, eine in Wasser allein nicht lösliche Aminosubstanz in Lösung zu bringen, so kann Mineralsäure, aber nicht über 1/2-n-Konzentration gebraucht werden oder Essigsäure bis 50<sup>0</sup>/<sub>0</sub> oder fixes Alkali bis 1 n-Konzentration.

5. Eisessig.

6. 20 proz. Salzsäure.

Apparat. Die Zusammensetzung des Apparates ist aus Abb. 65 und 66 ersichtlich.

<sup>1)</sup> Darstellung nach van Slyke, D. D.: Handb. der biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7, S. 263. Vgl. Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 43, S. 3170. Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 185. 1911.

Das Gefäß *D* faßt 40—45 cm<sup>3</sup>, *A* ungefähr 35 cm<sup>3</sup> und die Bürette *B* 10 cm<sup>3</sup>. Das Desaminierungsgefäß *D* muß mit einem straffen Draht so fest von oben aufgehängt sein, daß die Drahtschlinge um das Capillarrohr herum wie ein festes Zentrum wirkt.

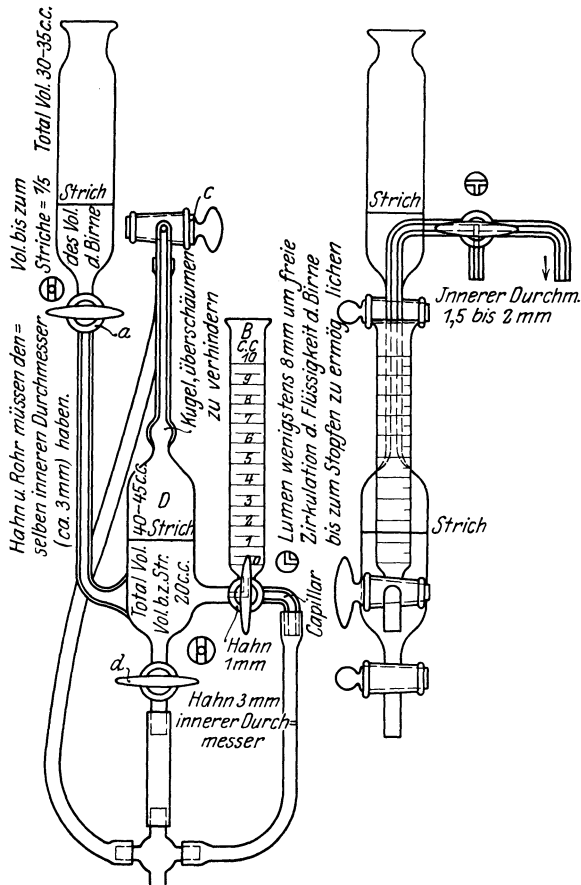


Abb. 65.

Das Gefäß *A* ist so angebracht, daß sein Schwerpunkt sich diesem Zentrum nähert. Das Gefäß *D* kann bereits durch eine geringfügige Bewegung von *A* zum Schütteln gebracht werden. Infolgedessen wird das Verbindungsrohr von *A* zu *D* durch Spannung oder Druck nicht gefährdet. Um zu vermeiden, daß die Hähne undicht oder bei heftigem Schütteln lose werden, reibt man sie



steht, und läßt schütteln. Nach 5 Min. wird die Reaktion beendet sein. Nur in solchen Fällen, wo native Eiweißkörper vorliegen, die beim Desamidieren grobe Koagula erzeugen, die beim Durchschütteln der Mischung störend wirken, kann es nötig sein, längere Zeit zu schütteln. Falls zum Analysieren eine visköse Flüssigkeit vorliegt und die Gefahr besteht, daß die Lösung in *F* überschäumt, so fügt man durch *B* etwas Octylalkohol (Kahlbaum-Octylalkohol [sekundär] I) hinzu, nachdem man daraus die Flüssigkeit hat auslaufen lassen,

3. Absorption des Stickoxydes und Messen des Stickstoffs. Sobald die Reaktion beendet ist, wird das Gas in *D* durch Hinzulassen von Flüssigkeit aus *A* nach *F* getrieben und das Gemisch von Stickstoff und Stickoxyd dann aus *F* in die Absorptionsbürette übergeführt. Die Treibstange wird dann mit der Pipette verbunden und diese nun 1 Min. lang durch den Motor geschüttelt, wobei das Stickoxyd vollständig absorbiert wird. Der reine Stickstoff wird in *F* gemessen. Während der letzterwähnten Operationen ist der Hahn *a* geöffnet, damit während der Bildung von Stickoxyd in *D* Flüssigkeit aus *D* entweichen kann.

Prüfung auf Vollständigkeit der Reaktion. Zur Prüfung auf Vollständigkeit der Reaktion treibt man den Stickstoff aus *F* durch *c* aus; *a* wird geschlossen und *D* mit *F* verbunden. Das Gas, daß sich in der salpetrigsauren Lösung in *D* während der Absorption des Stickoxydes und des Messens des Stickstoffs gebildet hat, wird ausgeschüttelt, nach *F* und dann in die Hempelsche Bürette wie früher übergetrieben. Nach Absorption des Stickoxydes sollte das Gasvolumen jetzt nicht mehr betragen als dasjenige, welches man bei einem blinden Versuch gewöhnlich erhält, nämlich ungefähr  $0,1 \text{ cm}^3$ .

Nachdem nun nach Beendigung der Reaktion das Gas vollständig aus *D* nach *F* übergetrieben worden ist, läßt man die salpetrige Säurelösung aus *D* durch den geöffneten Hahn *d* durch ein Ausflußrohr abfließen. *B* wird dann ausgespült und mit Filterpapier oder mit Alkohol und Äther getrocknet. Der Apparat ist nun für eine neue Bestimmung vorbereitet.

Sobald man eine neue Nitritlösung benutzt, muß eine blinde Bestimmung vorgenommen werden, und zwar so, daß man unter den üblichen Bedingungen arbeitet, aber anstatt der Aminostanzlösung  $10 \text{ cm}^3$  destilliertes Wasser verwendet. Die Menge Gas, welche man gewöhnlich bei einem blinden Versuch während 5 Min. erhält, beträgt  $0,3\text{--}0,4 \text{ cm}^3$ . Ammoniak ist in größeren Mengen hinderlich bei der Reaktion; man erhält aber bei Gegenwart

Dichte des feuchten, über Wasser  
Gewicht von 1 cm<sup>3</sup>

b	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°
700	1,097	1,092	1,087	1,082	1,077	1,072	1,067	1,062
702	1,100	1,095	1,090	1,085	1,080	1,075	1,070	1,065
704	1,103	1,098	1,093	1,088	1,083	1,078	1,073	1,068
706	1,106	1,101	1,096	1,091	1,086	1,081	1,076	1,071
708	1,109	1,104	1,099	1,094	1,089	1,084	1,079	1,074
710	1,112	1,108	1,103	1,098	1,093	1,087	1,082	1,077
712	1,116	1,111	1,106	1,101	1,096	1,091	1,086	1,080
714	1,119	1,114	1,109	1,104	1,099	1,094	1,089	1,083
716	1,122	1,117	1,112	1,107	1,102	1,097	1,092	1,087
718	1,125	1,120	1,115	1,110	1,105	1,100	1,095	1,090
720	1,128	1,123	1,118	1,113	1,108	1,103	1,098	1,093
722	1,131	1,127	1,122	1,116	1,111	1,106	1,101	1,096
724	1,135	1,130	1,125	1,120	1,114	1,109	1,104	1,099
726	1,138	1,133	1,128	1,123	1,118	1,112	1,107	1,102
728	1,141	1,136	1,131	1,126	1,121	1,116	1,110	1,105
730	1,144	1,139	1,134	1,129	1,124	1,119	1,114	1,108
732	1,147	1,142	1,137	1,132	1,127	1,122	1,117	1,111
734	1,151	1,146	1,140	1,135	1,130	1,125	1,120	1,115
736	1,154	1,149	1,144	1,138	1,133	1,128	1,123	1,118
738	1,157	1,152	1,147	1,142	1,136	1,131	1,126	1,121
740	1,160	1,155	1,150	1,145	1,139	1,134	1,129	1,124
742	1,163	1,158	1,153	1,148	1,143	1,137	1,132	1,127
744	1,166	1,161	1,156	1,151	1,146	1,141	1,135	1,130
746	1,170	1,165	1,159	1,154	1,149	1,144	1,138	1,133
748	1,173	1,168	1,162	1,157	1,152	1,147	1,142	1,136
750	1,176	1,171	1,166	1,160	1,155	1,150	1,145	1,139
752	1,179	1,174	1,169	1,164	1,158	1,153	1,148	1,142
754	1,182	1,177	1,172	1,167	1,161	1,156	1,151	1,145
756	1,185	1,180	1,175	1,170	1,165	1,159	1,154	1,149
758	1,189	1,184	1,178	1,173	1,168	1,162	1,157	1,152
760	1,192	1,187	1,181	1,176	1,171	1,165	1,160	1,155
762	1,195	1,190	1,185	1,179	1,174	1,169	1,163	1,158
764	1,198	1,193	1,188	1,182	1,177	1,172	1,166	1,161
766	1,201	1,196	1,191	1,186	1,180	1,175	1,170	1,164
768	1,205	1,199	1,194	1,189	1,183	1,178	1,173	1,167
770	1,208	1,202	1,197	1,192	1,186	1,181	1,176	1,170

der für gewöhnlich vorhandenen, verhältnismäßig kleinen Mengen von Ammoniak ganz gute Vergleichsresultate, falls die gleichen Reaktionsbedingungen in Hinsicht auf Zeit, Temperatur und die Konzentration der Lösungen genau innegehalten werden, so daß also die Menge des zersetzten Ammoniaks bei jeder Bestimmung die gleiche ist. Für eine genaue Bestimmung des NH<sub>2</sub>-Stickstoffes in Verdauungsflüssigkeiten usw. ist es ratsam, zuerst das Ammoniak zu entfernen. Das Ammoniak kann bequem entfernt und bestimmt

aufgefangenen, argonfreien Stickstoffs.  
in Milligramm.

18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°	25°	b
1,057	1,051	1,046	1,041	1,036	1,030	1,025	1,019	700
1,060	1,055	1,049	1,044	1,039	1,033	1,028	1,022	702
1,063	1,058	1,052	1,047	1,042	1,036	1,031	1,025	704
1,066	1,061	1,056	1,050	1,045	1,039	1,034	1,028	706
1,069	1,064	1,059	1,053	1,048	1,042	1,037	1,031	708
1,072	1,067	1,062	1,056	1,051	1,045	1,040	1,034	710
1,075	1,070	1,065	1,059	1,054	1,048	1,043	1,037	712
1,078	1,073	1,068	1,062	1,057	1,052	1,046	1,040	714
1,081	1,076	1,071	1,065	1,060	1,055	1,049	1,043	716
1,084	1,079	1,074	1,068	1,063	1,058	1,052	1,046	718
1,088	1,082	1,077	1,072	1,066	1,061	1,055	1,049	720
1,091	1,085	1,080	1,075	1,069	1,064	1,058	1,052	722
1,094	1,088	1,083	1,078	1,072	1,067	1,061	1,055	724
1,097	1,091	1,086	1,081	1,075	1,070	1,064	1,058	726
1,100	1,095	1,089	1,084	1,078	1,073	1,067	1,061	728
1,103	1,097	1,092	1,087	1,081	1,076	1,070	1,064	730
1,106	1,101	1,095	1,090	1,084	1,079	1,073	1,068	732
1,109	1,104	1,098	1,093	1,088	1,082	1,076	1,071	734
1,112	1,107	1,102	1,096	1,091	1,085	1,079	1,074	736
1,115	1,110	1,105	1,099	1,094	1,088	1,082	1,077	738
1,118	1,113	1,108	1,102	1,097	1,091	1,085	1,080	740
1,121	1,116	1,111	1,105	1,100	1,094	1,088	1,083	742
1,125	1,119	1,114	1,108	1,103	1,097	1,091	1,086	744
1,128	1,122	1,117	1,111	1,106	1,100	1,094	1,089	746
1,131	1,125	1,120	1,114	1,109	1,103	1,097	1,092	748
1,134	1,128	1,123	1,117	1,112	1,106	1,100	1,095	750
1,137	1,131	1,126	1,120	1,115	1,109	1,103	1,098	752
1,140	1,135	1,129	1,123	1,118	1,112	1,107	1,101	754
1,143	1,138	1,132	1,127	1,121	1,115	1,110	1,104	756
1,146	1,141	1,135	1,130	1,124	1,118	1,113	1,107	758
1,149	1,144	1,138	1,133	1,127	1,121	1,116	1,110	760
1,152	1,147	1,141	1,136	1,130	1,124	1,119	1,113	762
1,155	1,150	1,144	1,139	1,133	1,127	1,122	1,116	764
1,158	1,153	1,148	1,142	1,136	1,130	1,125	1,119	766
1,162	1,156	1,151	1,145	1,139	1,133	1,128	1,122	768
1,165	1,159	1,154	1,148	1,142	1,137	1,131	1,125	770

werden durch Destillation unter Zusatz von Calciumhydroxyd unter vermindertem Druck. Nach der Destillation wird der Überschuß des Calciumhydroxyds mit Essigsäure gelöst. — Die zu analysierenden Lösungen sollen frei von Äthylalkohol und Aceton sein. — Zur Verminderung des Schäumens soll nicht Amylalkohol, sondern Caprylalkohol (Octylalkohol, sekundär I, Kahlbaum) verwendet werden.

Zur Berechnung der Resultate diene obenstehende Tabelle.

Die Zahlen mit 2 dividiert stellen die Gewichte des Amino- stickstoffs in Milligrammen dar, die  $1 \text{ cm}^3$  Stickstoffgas entsprechen, wie man ihn bei der Einwirkung mit salpetriger Säure und beim Messen über Wasser bei den angegebenen Temperaturen und dem betreffenden Barometerstand erhält.

Modifikation der Methode mit Benutzung des Mikro- apparates. Durch eine geringfügige Änderung der Form der Gas- bürette wird die Genauigkeit des Ablesens so erleichtert, daß der Ge- halt des ganzen Apparates auf ein Zehntel des oben beschriebenen Inhalts reduziert werden kann, so daß nur  $1 \text{ cm}^3$  der Lösung für die Bestimmung erforderlich ist. Die Form der Bürette ist aus Abb. 67 er- sichtlich. Der wesentlichste Unterschied besteht darin, daß der Nullpunkt statt am Boden des Hahnes in einem Capillar- rost angebracht ist, welcher sich einige Millimeter unter dem Maße befindet. Die Bürette besitzt einen Inhalt von  $3 \text{ cm}^3$  und ist in Hundertstel Kubikzentimeter eingeteilt mit ca.  $1 \text{ mm}$  weiten Teil- strichen, so daß man durch Abschätzung der Zehntel der Einteilung bis  $0,001 \text{ cm}^3$  ablesen kann.

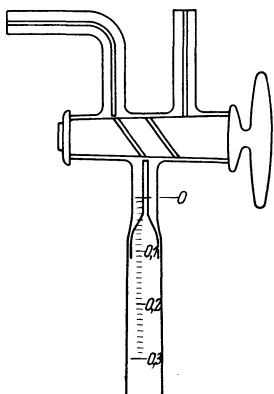


Abb. 67.

Jede bekannte Aminosäure, die aus Eiweiß durch Säurehydrolyse erhalten worden ist, reagiert quantitativ mit einem N-Atom, ausgenommen Lysin, das mit zwei N-Atomen reagiert, und Prolin und Oxyprolin, die überhaupt nicht in Reaktion tre- ten. Ferner mit Ausnahme des Tryptophans, das mit der Hälfte, des Histidins, das mit einem Drittel, und des Arginins, das mit einem Viertel des gesamten Stickstoffes reagiert. Asparagin re- agiert nur mit seiner primären Aminogruppe. — Bei den Poly- peptiden wird das Stickstoffgas nur durch Reaktion mit der einen freien  $\text{NH}_2$ -Gruppe entwickelt. Nur die Glycylpolypeptide geben statt  $1 \text{ Mol}$   $1,25 \text{ Mol N}$  ab<sup>1)</sup>.

Berechnung. Der Umfang der abgelaufenen Proteolyse wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Prozent der Hydrolyse} = \frac{100 (A - A_0)}{A_1 - A_0}.$$

$A$  bedeutet dabei den jeweils gefundenen Aminostickstoff;  $A_0$  den

<sup>1)</sup> Vgl. van Slyke: l. c. S. 280.

Aminostickstoff des unangegriffenen Proteins vor der Hydrolyse,  $A_1$  den Aminostickstoff nach vollständiger Hydrolyse. Da  $A_0$  verhältnismäßig klein ist, kann es bei der Berechnung unberücksichtigt bleiben, falls die Bedingungen eine experimentelle Bestimmung seines Wertes verhindern; z. B. wenn das unverdaute Eiweiß unlöslich ist, dann rechnet man mit der Gleichung Hydrolyse =  $\frac{100 A}{A_1}$ .

Beispiel<sup>1)</sup>: Verdauung von Edestin durch Trypsin. 150 cm<sup>3</sup> Wasser, 6 g luftgetrockenes Edestin, 0,5 g Soda, 0,6 g Grüblers Trypsin. Temperatur 37°. Von Zeit zu Zeit werden 5 cm<sup>3</sup> für die Aminostickstoffbestimmung entnommen.

Stunden	cm <sup>3</sup> N-Gas reduziert auf 0° und 760 mm	% von N	Umfang der Hydrolyse in %
0	1,97 <sup>2)</sup>	3,68	0,00
2	7,62	14,93	14,77
4	8,92	17,47	18,15
20	12,62	24,75	27,40
80	19,56	38,35	47,30
Vollständige Hydrolyse mittels Salzsäure . . . . .	40,25	79,00	100,00

Zur vollständigen Hydrolyse werden die Proteine am Rückflußkühler mit 20 proz. Salzsäure (1 Volumen konzent. HCl und 1 Volumen Wasser) gekocht, bis die Menge des Aminostickstoffes das Maximum erreicht hat. Dieser Punkt wird bequem so bestimmt, daß man in Intervallen von einigen Stunden mit einer Pipette abgemessene Proben, die ungefähr 0,1 g Stickstoff enthalten, entnimmt und sie für die Aminobestimmungen auf je 10 cm<sup>3</sup> verdünnt. Falls die Proben mehr als 1,00 cm<sup>3</sup> betragen, soll die Säure mit einer konzentrierten Lösung von Alkali neutralisiert werden, ehe sie bis auf 10 cm<sup>3</sup> verdünnt wird. Der Kolben, in dem die Lösung gekocht wird, soll tariert sein und vor der Entnahme einer jeden Probe gewogen werden, um die Konzentrationsänderung der Lösung, die durch Verdampfung durch den Rückflußkühler vor sich gehen kann, festzustellen.

<sup>1)</sup> Nach van Slyke: l. c. S. 283.

<sup>2)</sup> 0,77 cm<sup>3</sup> des Stickstoffs oder 1,5% entstammen dabei dem Aminostickstoff des zugefügten Trypsins. Vom Edestin selbst reagieren nur 2,4% Stickstoff mit der salpetrigen Säure.



Bestimmung nach Willstätter<sup>1)</sup>.

Aminosäuren kann man ebensogut wie eine hohe Fettsäure in alkoholischer Lösung alkalimetrisch bestimmen. Wenn Salze der Aminosäuren mit Mineralsäuren vorliegen, so kann man zuerst in wässriger Lösung auf neutral und dann nach Zusatz von Alkohol wieder bis Phenolphthalein-Rötung titrieren. Ebenso lassen sich Polypeptide unter Zusatz von Alkohol alkalimetrisch bestimmen.

Bei der alkalimetrischen Bestimmung von Eiweißabbauprodukten zeigt sich nun ein charakteristischer Unterschied hinsichtlich der Alkoholkonzentration, die zur Ausschaltung der Aminogruppen oder der Hydroxylionen erforderlich ist. Bei den Polypeptiden erreicht man dies schon durch 40proz. Alkohol; ebenso bei Peptonen und Proteinen. Dagegen erfordern die Aminosäuren der aliphatischen Reihe oder von aliphatischem Charakter sehr hohe Alkoholkonzentrationen, etwa 97<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, zur völligen Ausschaltung der Aminogruppe und Absättigung der Carboxylgruppe mit Alkalihydroxyd. Man muß daher auch das Wasser der n-Lauge berücksichtigen und ersetzt diese zweckmäßig durch eine alkoholische Normallösung. Auf diese Verschiedenheit der Alkoholkonzentrationen, die bei Aminosäuren und Polypeptiden zur Ausschaltung der Aminogruppe erforderlich sind, gründeten Willstätter und Waldschmidt-Leitz die Methode, um in Gemischen dieser beiden Gruppen von Verbindungen, wie sie beim enzymatischen Abbau der Proteine auftreten, den Anteil an Aminosäuren und an Peptiden alkalimetrisch zu bestimmen. Man verfährt dabei wie folgt:

Man ermittelt die zur Neutralisation auf Phenolphthalein in 50proz. (a), in 97proz. (b) alkoholischer Lösung erforderliche Alkalimenge. Der Alkalianteil  $x$  für Aminosäuren ist dann, da die Mehrzahl derselben, und zwar die in den Mischungen im allgemeinen überwiegenden, in 50proz. alkoholischer Lösung 28<sup>0</sup>/<sub>0</sub> der zu ihrer völligen Absättigung erforderlichen Alkalimenge verbrauchen:

$$x = \frac{100(b - a)}{100 - 28} \text{ und der Alkalianteil für Polypeptide} = b - x.$$

Zur Erläuterung diene folgendes Beispiel<sup>2)</sup>: Ein Pankreatinpräparat (10 cm<sup>3</sup> 5proz. Lösung) wurde geprüft durch zweistündige

<sup>1)</sup> Nach Willstätter: Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7. S. 289. — Willstätter, R. u. E. Waldschmidt-Leitz: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 54, S. 2988. 1921.

<sup>2)</sup> Willstätter, R.: l. c. S. 293.

Einwirkung auf 0,5 g Globulin bei 30° unter Zusatz von 10 cm<sup>3</sup> Pufferlösung von  $p_h = 7,7$  (5 cm<sup>3</sup> n/2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 cm<sup>3</sup> n-KOH und 4 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O). Da das Verfahren den Nachteil hat, viel Alkohol zu erfordern, kann man sich öfters mit der Konzentration von 90% begnügen.

	Zu Beginn	Nach 2 Std.	Differenz
In 50 proz. Alkohol . . .	0,37	1,30	0,93 cm <sup>3</sup> n-KOH
In 90 proz. Alkohol . . .	1,18	2,44	1,26 cm <sup>3</sup> n-KOH

Vom Zuwachs der Acidität infolge der Trypsinwirkung entfallen unter Zugrundelegung obiger Formel  $x = \frac{100(1,26-0,93)}{72}$   
 $= 0,46$  cm<sup>3</sup> auf Aminosäuren und  $b - x = 1,26 - 0,46 = 0,80$  cm<sup>3</sup> auf Polypeptide.

Bestimmung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup>.

Ausführung: Das zu bestimmende Trypsinpräparat (im allgemeinen zwischen 0,01 und 0,25 g getrocknete Drüse bzw. die daraus hervorgegangene Menge reineren Präparats) wird in ein kleines zylindrisches Standfläschchen mit eingeschliffenem Stopfen eingewogen; nach der etwa erforderlichen Vorbehandlung (z. B. Kinaseeinwirkung) werden dann im Thermostaten von 30° 1,00 cm<sup>3</sup> n-Ammoniak-Ammonchloridpuffer von  $p_h = 8,9$  bei 30° (bestehend aus 0,67 cm<sup>3</sup> n-NH<sub>4</sub>Cl-0,33 cm<sup>3</sup> n-NH<sub>3</sub>) sowie 5,0 cm<sup>3</sup> einer 3 proz., auf 30° angewärmten Gelatinelösung (bzw. Pepton-, Albuminlösung) zugefügt und gut durchgeschüttelt. Der  $p_h$  dieser Gelatine-Puffermischung (bei 30°) ist 8,7.

Nach Ablauf der Bestimmungszeit (gewöhnlich 60 Min.) wird der Inhalt des Fläschchens mit dem 9fachen Volumen absoluten Alkohols in einen Erlenmeyerkolben übergespült und nach Zusatz von 0,5 cm<sup>3</sup> 0,5proz. alkoholischer Thymolphthaleinlösung auf je 100 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit mit 90proz. alkoholischer 0,2-n-Lauge unter kräftigem Umschütteln titriert. Der Endpunkt der Titration ist durch den ersten etwas grau-blauen Farbton gegeben und gut erkennbar; nach Zusatz von 3 weiteren Tropfen (etwa 0,05 cm<sup>3</sup>) der Normallösung wird dann die Farbe deutlich blau. Nach einigen Minuten pflegt die Indicatorfarbe infolge einer weiteren Hydrolyse der Proteinsubstanz durch den Laugenüberschuß wieder zu verschwinden.

<sup>1)</sup> Waldschmidt-Leitz: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 181 (S. 201). 1924.

Zu jeder Bestimmung ist eine Leerbestimmung auszuführen, deren Ansatz analog dem der Hauptbestimmung erfolgt; die der Enzymwirkung entsprechende Aciditätszunahme ergibt sich dann aus der Differenz der beiden Titrationsen. Es empfiehlt sich noch, bei Benutzung von Gelatine als Substrat dem Analysengemisch vor dem Verdünnen mit Alkohol etwas Chlorcalciumlösung, z. B.  $0,50 \text{ cm}^3$  mit  $20 \text{ mg CaCl}_2$ , zuzusetzen; man vermeidet so, daß unangegriffene Gelatine sich bei der Ausfällung durch den Alkohol zu größeren Klumpen zusammenballt und dadurch z. T. der Titration entgeht.

Der mögliche Fehler einer Titration ist auf  $\pm 0,04 \text{ cm}^3 \text{ n}/5$ -Lauge zu schätzen, entsprechend ungefähr  $\pm 2$  Tropfen der alkoholischen Lösung.

#### Modifikation der Willstätterschen Methode nach Willstätter und Persiel<sup>1)</sup>.

Nach den Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz über die Enterokinase (vgl. S. 261) gelangt das Trypsin bei der adsorptiven Trennung aus dem vollaktiven in den unvollständig aktivierten Zustand. Ferner entstehen aus der Drüse sowohl als auch aus den Auszügen der Drüse Hemmungskörper der Kinase, und die bei der Verdauung entstehenden Abbauprodukte wirken wahrscheinlich in gleichem Sinne. Es ist daher notwendig, den bei der Trypsinbestimmung entstehenden Fehler der unvollständigen Aktivierung des Enzyms durch Anwendung großer Substratmengen (Gelatine), kleiner, ausreichend aktivierter Enzymmengen und kurzer Einwirkungszeit zu vermeiden.

Es ist auch zweckmäßig, hohe Pufferkonzentrationen zur Einstellung des  $p_h$  zu vermeiden. Es wurde mit einer kleinen Menge eines  $\text{n-NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ -Gemisches im Verhältnis 1 : 2 vom  $p_h$  8,9 (für  $30^\circ$ ) eingestellt, das mit der angewandten Gelatine einen  $p_h$  von wenig über 8 ergibt.

Ein solcher Ansatz ist z. B.:

10 mg Drüsenpulver in  $1,2 \text{ cm}^3$  Wasser, während 30 Min. mit  $0,3 \text{ cm}^3$  Kinaselösung aktiviert,  
 $2,000 \text{ cm}^3$   $\text{n-NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ -Gemisch 1 : 2 und  $3,5 \text{ cm}^3$  Wasser,  
 $5,0 \text{ cm}^3$  15 proz. Gelatinelösung,  
 20 Min. bei  $37^\circ$ .

Erforderliche Lösungen. 1. 15proz. Gelatine.  $37,5 \text{ g}$  zerleinerte gute Handelsgelatine werden in heißem Wasser gelöst und auf  $250 \text{ cm}^3$  aufgefüllt. Wenn sie aufbewahrt werden soll,

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 245. 1925.

wird sie mit Thymol versetzt. Die Lösung bleibt im Thermostaten von 37° flüssig.

2. Trypsinlösung. 1—2 g Pankreaspulver werden mit wenig Wasser zu einem Teig verrieben, darauf langsam, schließlich schneller mit Wasser, insgesamt 100 cm<sup>3</sup>, angerührt und sofort filtriert. Das einwandfreieste Material ist der erste Teil des Filtrats, der tryptisch unwirksam ist. Die Lösung ist nicht haltbar.

3. Enterokinase. 5 g getrocknete Dünndarmschleimhaut (siehe S. 261) werden mit 250 cm<sup>3</sup> n/20-Ammoniak 2 Std. lang bei 30° behandelt und der Auszug im Faust-Heimschen Apparat auf das halbe Volumen eingengt.

4. n-NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl-Puffer im Verhältnis 1 : 2.

5. Lösungen zur Titration siehe S. 254.

Als Trypsineinheit wird die tryptische Leistung bezeichnet, die unter den vorgeschriebenen Bedingungen einen Aciditätszuwachs entsprechend 2,00 cm<sup>3</sup> 0,200-n-KOH hervorruft. Die Bedingungen sind: Vorbehandlung bei 37° während 30 Min. mit Enterokinase (0,3 cm<sup>3</sup> Auszug 1 : 50 aus trockener Darmschleimhaut); Substrat 0,75 g Gelatine; im Volumen von 12 cm<sup>3</sup> enthaltend 2,000 cm<sup>3</sup> n-NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl-Puffer 1 : 2; Dauer 20 Min. bei 37°. Diese Einheit ist enthalten in ca. 10 mg Pankreaspulver oder 0,2 cm<sup>3</sup> Glycerinauszug 1 : 16 oder 2 cm<sup>3</sup> Wasserauszug 1 : 100.

Ausführung. Die Enzymprobe, die ungefähr 10 mg des Trockenpankreas entsprechen soll, wird in Fläschchen mit eingeschlifftem Stopfen von 15—25 cm<sup>3</sup> Inhalt mit 0,3 cm<sup>3</sup> (10 Tropfen) Enterokinaselösung und mit Wasser auf 1,5 cm<sup>3</sup> gebracht, bei verdünnten Enzymlösungen auf 5,0 cm<sup>3</sup>, und zur Aktivierung eine halbe Stunde auf 37° erwärmt. Nach Auffüllung auf 5 cm<sup>3</sup> Gesamtvolumen setzt man 2,000 cm<sup>3</sup> der Pufferlösung hinzu, bläst rasch 5,0 cm<sup>3</sup> im Thermostaten erwärmte 15proz. Gelatinelösung aus vorgewärmter Pipette hinzu und schüttelt kurz durch. Nach 20 Min. nimmt man die Fläschchen aus dem Thermostaten und bricht die Reaktion durch Eingießen in 55 cm<sup>3</sup> siedenden absoluten Alkohol ab. Das Gefäß wird mit weiteren 55 cm<sup>3</sup> des heißen Alkohols nachgespült, der zuvor mit einigen Tropfen 0,2-n-KOH eben alkalisch auf Thymolphthalein (0,5 cm<sup>3</sup> 0,5proz. Lösung) gemacht worden ist. Man titriert sofort mit 0,2-n-alkoholischer Kalilauge unter Schütteln bis zum Auftreten eines graublauen oder grünlich-blauen Farbtones. Über die Einzelheiten der Titrierung siehe S. 254.

Der von der gesamten Acidität der hydrolysierten Probe abzuziehende Betrag für den Titer der Gelatine, des Enzympräparates und des Puffers ist im Vergleichsversuch zu ermitteln. Das

klumpenförmige Ausfällen der nicht veränderten Gelatine muß durch geschicktes, rasches Vermischen mit dem heißen Alkohol vermieden werden. Man gießt den Ansatz des Kontrollversuchs, der dem Spaltversuch, abgesehen vom Fehlen der Gelatine, genau nachgebildet und der genau gleich behandelt worden ist, in einen weithalsigen Erlenmeyerkolben, spült mit wenig Alkohol nach und neutralisiert nach Zusatz eines Tropfens Thymolphthalein mit der Titrationslauge. Dann werden 5,0 cm<sup>3</sup> Gelatinelösung eingeblasen und rasch unter Umschwenken die restliche Hauptmenge der 110 cm<sup>3</sup> siedenden Alkohols hinzugegeben. Die Lösung muß milchig trüb sein, es dürfen sich höchstens feine Fäden abscheiden. Die Alkoholmengen und die Temperaturen bei der Titration müssen bei dem Spaltungsversuch und dem Kontrollversuch genau gleich gehalten werden (Fehler  $\pm 0,10$  cm<sup>3</sup>).

#### Nephelometrische Bestimmung der Trypsinwirkung nach P. Rona und H. Kleinmann<sup>1</sup>).

Die Bestimmung der Trypsinwirkung wird so vorgenommen, daß in einem Gefäße bestimmte Mengen von Natriumcaseinatlösungen mit Wasser, Puffer und Fermentlösung vermischt werden und die Mischung im Thermostaten der Spaltung überlassen wird. In bestimmten Zeitabständen werden der Mischung gleiche Volumina entnommen. Die entnommenen Portionen, in denen die Spaltung unmittelbar nach der Entnahme unterbrochen wird, werden durch Einfließenlassen in eine bestimmte Pufferlösung auf einen für die Analyse notwendigen  $p_h$  gebracht und mit einem Trübungsreagens (Chinidin) versetzt. Die entstehenden Eiweißtrübungen werden dann mit einer Entnahme vor Fermentzusatz — die gleich 100<sup>0</sup>/<sub>0</sub> gesetzt wird, da sie noch das ganze ungespaltene Eiweiß enthält — verglichen. Die Spaltung wird in Prozenten ausgedrückt.

#### Erforderliche Lösungen.

Caseinlösung. Diese wird durch Lösen von 5 g Casein (Hammarsten) in 12 cm<sup>3</sup> n/1-Natronlauge und Auffüllen der Lösung mit Aqua dest. ad 2000 hergestellt.

Die Lösung, deren  $p_h$  nach der Herstellung etwa 8,82 ist, wird unter Toluolzusatz im Eisschrank aufbewahrt. Die Lösung zeigt nach einiger Zeit Trübung. Zum Versuch wird ein Anteil durch quantitative Filter mehrmals filtriert. Wird er nicht völlig klar, so schadet das nichts, da sich das Casein im Versuchssystem durch die Zugabe von Puffern völlig klar löst.

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 169, S. 320. 1926.

Versuchspuffer. Als Puffer, der dem System zugesetzt wird, ist je nach der gewünschten Acidität Phosphatpuffer ( $p_h$  5—8) oder Glykokollpuffer ( $p_h$  8—10) zu nehmen. Die Konzentration der Puffer darf nicht zu groß sein, denn einmal soll die Salzwirkung auf die Fermente nicht unnötig stark werden und dann muß die Acidität der Lösung durch einen noch stärker konzentrierten andern Puffer nach der Spaltung auf die für die Analyse notwendige Acidität gebracht werden. Es wurden m/15-Puffer verwandt, deren Konzentration, da sie im Versuch auf ca. das Dreifache verdünnt werden, im System etwa  $\frac{1}{45}$  mol. beträgt.

Als Vorlagepuffer, der die Entnahmen auf den für die Analyse notwendigen  $p_h$  zu bringen hat, werden m/15-Phosphatpuffer verwendet. Die Acidität der Lösungen, die für die Analyse etwa 7,8 sein soll, wird bei einer Spaltungsacidität von etwa 7,5—8,0 erhalten durch Anwendung eines Vorlagepuffers von 35,2 Teilen sekundären und 4,8 Teilen primären Phosphats.  $p_h$  dieses Puffers ist 7,78. Bei anderen Spaltungsaciditäten ist es notwendig, einen andern Vorlagepuffer anzuwenden, um bei der Bestimmung in den Lösungen eine Acidität von ca. 7,78 zu erzielen.

So wurden bei einer Spaltungsacidität von 5,76 ein Vorlagepuffer vom  $p_h$  8,02 verwandt und in der Mischung 7,78 erreicht, bei einer Spaltungsacidität von 7,78 wurde ein Puffer von 7,70 verwandt und ergab 7,78, bei  $p_h$  8,02 Spaltung Vorlage 7,65, bei 9,5 Spaltung Vorlage 6,7.

Sollen variierende Aciditäten zur Spaltung benutzt werden, so ist der Vorlagepuffer zu erproben, der bei den später angegebenen Mischungsvolumina den  $p_h$  der endgültig zu analysierenden Lösung auf ca. 7,78 bringt.

Chinidinlösung. Als Trübungsreagens dient eine heiß-gesättigte Lösung von Chinidinum hydrochloricum. Die gesättigte Lösung muß, da sie sehr langsam auskristallisiert, nach ihrer Herstellung mindestens 12 Std. lang gestanden haben. Zum Versuch wird ein Teil der Lösung abfiltriert.

Als Ferment dienen bei den Versuchen Aufschlämmungen von Pankreatin Rhenania oder Pankreasdispert (Krause) in einer Konzentration 1:20 mit Aqua dest. Die Aufschlämmung bleibt unter gelegentlichem Umrühren ca. 10 Min. bei Zimmertemperatur stehen, wird dann filtriert und mit Aqua dest. verdünnt. Die geeigneten Konzentrationen beispielsweise bei Pankreatin Rhenania waren bei Spaltungen über 30 Min. etwa Verdünnungen von 1:3000, bei Spaltungen über 2 Std. etwa 1:8000. Da diese Fermentlösung im Versuchssystem noch ca. um das 10fache verdünnt wird, beträgt die endgültige Konzentration etwa 1:30000 bis 1:80000.

Durch Hineinfließenlassen der Entnahme in kochendes Wasser wird die Fermentwirkung sofort unterbrochen.

Die Caseinlösungen flocken beim Kochen nicht aus. Jedoch ändert sich die Beschaffenheit des Eiweißes mit der Kochzeit derart, daß die Trübungsreaktion mit Chinidin verschieden stark ausfällt. Die Trübungsreaktion von Caseinlösungen mit Chinidin ist bei gekochten Lösungen stärker als mit ungekochten. Diese Änderung der Reaktionsart erreicht aber bei einer Kochzeit von 6 Min. ein Maximum, um dann konstant zu bleiben. Auch ist die Änderung der Reaktion bei verschiedenen konzentrierten Eiweißlösungen völlig proportional der Konzentration, so daß die Proportionalität der Trübung mit der Konzentration durch das Kochen nicht beeinflußt wird.

Ausführung. In je einen 75 cm<sup>3</sup> fassenden Meßzylinder werden 12,0 cm<sup>3</sup> Caseinlösung, 15 cm<sup>3</sup> m/15-Phosphatpuffer (beispielsweise bei einer Spaltung bei einem  $p_h$  von 8,02 ein Puffer, der aus 9,9 Teilen sekundären und 0,1 Teil primären Phosphates besteht) und Wasser ad 46 cm<sup>3</sup> einpipettiert und vermischt. Der Versuch soll z. B. 30 Min. dauern und 7 Abnahmen enthalten. Es werden hierzu 28 große, ca. 25 cm<sup>3</sup> fassende Reagensgläser vorbereitet<sup>1)</sup>. Die Reagensgläser sollen eine Marke bei 20 cm<sup>3</sup> Volumen tragen. Sie enthalten je 5 cm<sup>3</sup> Wasser und stehen in einem Wasserbade, das siedet.

Nunmehr werden aus jedem Meßzylinder 10 cm<sup>3</sup> entnommen, je 4,5 werden in ein Reagensglas pipettiert und je 5,5 cm<sup>3</sup> verworfen. Es werden bei dieser ersten Abnahme deshalb nicht 5 cm<sup>3</sup> wie bei den späteren entnommen, weil das System nunmehr durch Zugabe von Fermentlösung verdünnt wird.

Die Lösungen bleiben genau 6 Min. in den Reagensgläsern im siedenden Wasserbade und werden dann in kaltem Wasser abgekühlt. Ebenso werden stets alle folgenden Abnahmen behandelt. Sie bleiben 6 Min. im Wasserbade, und werden dann abgekühlt. Der Zusatz von Trübungsreagens darf erst nach völligem Temperatenausgleich erfolgen. Die 4 Meßzylinder, die vor der ersten Entnahme bereits in einem Wasserbadthermostaten auf 37° vorgewärmt worden waren, werden nunmehr zu einer genau markierten Zeit mit 4 cm<sup>3</sup> klar filtrierter vorgewärmter Fermentlösung versetzt und mittels Pipette durchmischt. In Abständen von je 5 Min. werden — mit stets der gleichen Pipette — je 5 cm<sup>3</sup> aus

<sup>1)</sup> Jeder Versuch enthält 7 Bestimmungen. Wird die Wirkung derselben Fermentkonzentration unter verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen und wird jeder Versuch doppelt ausgeführt, so hat man 4 Versuchsreihen.

jedem Meßzylinder entnommen und in die kochende Vorlage gegeben. Nach der 7. Entnahme (nach 30 Min. Spaltung) bleiben 10 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit als Rest, die zur  $p_h$ -Bestimmung dienen.

Die gekochten Entnahmen können, sobald sie abgekühlt sind, sofort analysiert werden oder können zugestopft beliebig lang aufbewahrt werden.

Zur Bestimmung kommen in die Reagensgläser 5 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer m/15, der die Acidität der Lösung auf 7,78 bringt.

Zu der Mischung werden 5 cm<sup>3</sup> der kalten gesättigten Chinidinlösung gegeben. Das Volumen der Mischung wird durch Auffüllen mit Wasser bis zur Reagensglasmarke auf 20 cm<sup>3</sup> gebracht.

Der Vergleich erfolgt von 3 Minuten nach der Reagenszugabe an im Nephelometer nach Schmidt und Haensch (vgl. S. 30) innerhalb von etwa 45 Min. gegen die erste Abnahme, deren Konzentration gleich 100<sup>0</sup>/<sub>0</sub> gesetzt wird. Die Vergleichslösung wird zweckmäßig auf 20 gesetzt. Die Nephelometerablesungen verhalten sich umgekehrt proportional den Konzentrationen.

### Enterokinase.

Das Trypsin bedarf der Aktivierung durch Enterokinase, um höher molekulare Proteine spalten zu können; in gewissen anderen Fällen, so bei Histon, Protamin oder auch Pepton, wirkt aber das Trypsin auch ohne Aktivator beträchtlich [Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup>].

Über die Spezifität von Pankreastrypsin und Pankreaserepsin (vgl. S. 265) gibt folgende Tabelle Aufschluß.

— = keine nachweisbare, + = positive, ++ = verstärkte Hydrolyse.

Substrat	Erepsin	Trypsin	Trypsin + Enterokin.
1. Alanylglycin . . . . .	+	—	—
2. Glycyltyrosin . . . . .	+	—	—
3. Glycylglycin . . . . .	+	—	—
4. Glycylalanin . . . . .	+	—	—
5. Leucylglycin . . . . .	+	—	—
6. Leucylalanin . . . . .	+	—	—
7. Leucylglycylglycin . . . . .	+	—	—
8. Pepton (ex albumine, Merck)	—	+	++
9. Clupein . . . . .	—	+	++
10. Thymushiston . . . . .	—	+	++
11. Casein . . . . .	—	—	+
12. Fibrin . . . . .	—	—	+
13. Gelatine . . . . .	—	—	+
14. Gliadin . . . . .	—	—	+
15. Zein . . . . .	—	—	+

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 149, S. 207. 1925.



## Trennung von Trypsin und Enterokinase.

Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup> hat nachgewiesen, daß die Wirkung der Enterokinase auf Trypsin nicht als enzymatischer Prozeß, sondern als ein einfacher Aktivierungsvorgang aufzufassen ist. Es gelingt, durch geeignete Adsorptionsmittel die Kinase aus dem Reaktionsgemisch, aktiviertes Trypsin-Enterokinase, zu entfernen und so das schon aktivierte Trypsin inaktiv, jedoch aktivierbar zu machen (vgl. S. 263). Das Trypsin wird demnach in der Pankreasdrüse nicht in unfertiger Zymogenform gebildet und erst durch die Enterokinase in aktives Enzym umgewandelt, sondern dem Aktivator kommt nur die Bedeutung eines Hilfsstoffs zu.

## Darstellung der Enterokinase.

Nach Waldschmidt-Leitz<sup>2)</sup>. Vom obersten Abschnitt des Schweinedünndarmes möglichst vieler Tiere schabt man die innerste weiche Schleimhaut mit dem Messer so vorsichtig ab, daß sie möglichst frei von Bindegewebe und Muskelfasern ist; die Masse wird mit der dreifachen Menge Aceton gut durchgeschüttelt und nach 2stündigem Stehen filtriert. Der Filtrerrückstand wird dann weiter durch Schütteln mit der dreifachen Menge Aceton und Filtrieren, darauf mit der 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>fachen Menge Aceton und 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>fachen Menge Äther und zuletzt zweimal mit je der dreifachen Menge Äther (immer auf das Gewicht der Ausgangssubstanz bezogen) gewaschen und auf Filtrierpapier an der Luft getrocknet. Das feine farblose Pulver wird nach Mahlen in einer Schlagmühle mittels eines engmaschigen Siebes von beigemischter Fasersubstanz befreit.

Die Kinase wird der Trockensubstanz (Darpulver) mit alkalischen Mitteln entzogen. Dazu werden z. B. 4,0 g des Darpulvers mit 225 cm<sup>3</sup> 87 proz. Glycerin geschüttelt und 40 Std. bei 30° aufbewahrt. Der Extraktionsrückstand wird mit 50 cm<sup>3</sup> 20 proz. Glycerin nachgewaschen und darauf 20 Std. mit 225 cm<sup>3</sup> n/25 Ammoniak bei 30° behandelt. Man kann aber die Dauer der Extraktion wesentlich abkürzen; so empfiehlt sich beispielsweise eine 3stündige Behandlung mit etwa 0,05 n-Ammoniak, und zwar mit je 50 cm<sup>3</sup> für 1 g des Trockenmaterials<sup>3)</sup>. Zur schnellen Vertreibung des (schädlichen) überschüssigen NH<sub>3</sub> wird die Lösung darauf im Faust-Heimschen Apparat einem auf 30—35° erwärmten Luftstrom bis zum Verschwinden der alka-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 181. 1923; Bd. 142, S. 217. 1924.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 181, 204, 235. 1923.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 217 (223).

lischen Reaktion unterworfen. Die so gewonnene Kinase ist erepsinfrei. Damit ist ein Verfahren zur Trennung von Kinase und Erepsin gegeben.

Die Kinase ist relativ gut (8 Tage) in wässriger Lösung bei neutraler Reaktion und Glycerinzusatz haltbar. Durch Kochen wird das Aktivierungsvermögen aufgehoben.

Die Kinase läßt sich durch Adsorption mittels Tonerde aus saurer Lösung sehr gut adsorbieren und so auch vom Trypsin trennen. Von dem Adsorbat wird der Aktivator an alkalische Phosphatlösung, die man zur Stabilisierung mit Glycerin versetzt, wieder abgegeben. Durch diese Adsorption aus saurer Lösung gelingt es, bereits aktiviertem Trypsin einen Teil seines Aktivators zu entziehen und es so in der Adsorptionsrestlösung in eine inaktive, aber aktivierbare Form überzuführen.

Um ein Trypsin-Kinasegemisch zu trennen, gibt Waldschmidt-Leitz folgendes Beispiel<sup>1)</sup>:

2,5 g des Pankreastrocknenpulvers wurden mit der zu voller Aktivierung eben ausreichenden Menge von 2,40 cm<sup>3</sup> eines ammoniakalischen Kinaseauszugs, sowie 80 cm<sup>3</sup> Thymolwasser 60 Min. lang bei 30° extrahiert, dann wurde durch Zentrifugieren vom Ungelösten getrennt.

Erste Adsorption: 40 cm<sup>3</sup> des Extrakts, angesäuert mit 0,50 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure wurden mit 10 cm<sup>3</sup> Tonerdesuspension (0,165 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Sorte C, siehe S. 141) adsorbiert und das einmal mit 20 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschene Adsorbat mit 40 cm<sup>3</sup> von „Ammoniumphosphat“ (siehe S. 143) in den Zentrifugengläschen eluiert.

Zweite Adsorption: 45 cm<sup>3</sup> der Restlösung von der ersten Adsorption wurden nochmals mit 10 cm<sup>3</sup> Tonerde adsorbiert, das Adsorbat mit 40 cm<sup>3</sup> Ammonphosphat eluiert. Durch Titration mittels alkoholischer Lauge orientiert man sich jeweils über die Trypsinwirkung der aktivierten resp. inaktivierten und reaktivierten Lösungen.

Ein noch reineres Präparat gewann Waldschmidt-Leitz folgendermaßen<sup>2)</sup>:

150 cm<sup>3</sup> frisch bereiteter und von überschüssigem NH<sub>3</sub> befreiter Kinaseauszug (aus 3 g getrockneter Schleimhaut) fällte er zunächst mit 7,5 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure. Aus der Mutterlauge schlug er die Kinase durch Zusatz von 2 l 96proz. Alkohol nieder und löste die Fällung in 180 cm<sup>3</sup> 45proz. Glycerins wieder auf. Die Lösung wurde 4 Std. im Eisschrank aufbewahrt, danach mit 94,5 cm<sup>3</sup> 0,05-n-Essigsäure verdünnt und nach Zugabe von

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 236. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 238. 1924.

6,0 cm<sup>3</sup> 2 proz. Gerbsäurelösung gefällt (wobei ein Teil des Aktivators mit den Begleitstoffen niedergeschlagen wurde) und zentrifugiert.

Nach dem Neutralisieren des noch saueren Auszugs mit 7,8 cm<sup>3</sup> n-NH<sub>3</sub> adsorbierte er die Kinase mit 8,8 cm<sup>3</sup> Tonerdesuspensionpräparat C (0,1452 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und eluierte aus dem Adsorbat durch Behandlung mit 200 cm<sup>3</sup> 0,05-n-Phosphatmischung ( $p_h = 7,0$ , 43% Glycerin enthaltend). Die mit 15 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure angesäuerte Elution unterwarf er einer weiteren Adsorption durch 100 cm<sup>3</sup> einer Aufschlammung von elektroosmotisch gereinigtem Kaolin (5,66 g) und eluierte das Adsorbat mit 200 cm<sup>3</sup> 0,05-n-Ammoniak, welches 43% Glycerin enthielt.

182 cm<sup>3</sup> der auf der Nutsche mittels Kieselgur geklärten Elution unterwarf er 6<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Tag lang der Dialyse in sog. Fischblasen und befreite sie dadurch von Glycerin und Salzen. Die Lösungen sind bei neutraler Reaktion und einem Glyceringehalt von ca. 30% bei Zimmertemperatur wochenlang haltbar.

#### Bestimmung der Kinase.

Nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz. Die Bestimmungsmethode für den Aktivator ist die, daß man die einer bestimmten Menge inaktiven Trypsins erteilten proteolytischen Wirkungen vergleicht, am besten gegenüber Gelatine. Weil aber aus der Drüse Stoffe entstehen, die der Aktivierung entgegenwirken, ist der Vergleich von Präparaten verschiedener Herkunft sehr schwierig. Um diese Schwierigkeit zu überwinden, geht man nach Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup> so vor, daß man einen Überschuß an hemmenden Drüseninhaltsstoffen eine „ausgleichende Hemmung“ anwendet.

Die zur ausgleichenden Hemmung benutzten Drüseninhaltsstoffe werden durch 7tägige Extraktion frisch getrockneter Pankreasdrüsen mit 16 Teilen thymolhaltigen Wassers gewonnen.

Zweckmäßiger ist es jedoch, für die Bestimmung einfach die Aktivierung eines bestimmten, geeigneten Trypsinmaterials zugrunde zu legen. Als Einheit der Kinasemenge wählte Waldschmidt-Leitz<sup>2)</sup> das 1000fache derjenigen Aktivatormenge, die 0,062 g seiner Pankreasprobe in 1/2stündiger Einwirkung bei 30° eine tryptische Wirkung entsprechend einer Aciditätszunahme von 0,90 cm<sup>3</sup> 0,2-n erteilte.

1) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 219. 1924.

2) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 226. 1924.

### Erepsin.

Das Ferment der Darmschleimhaut, das von Cohnheim gefunden und von ihm Erepsin genannt wurde, wirkt nach neueren Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup> nur auf Peptide. Weder Pepton der peptischen Verdauung, noch Protamin oder Histon, noch Casein, Fibrin, Gelatine, Gliadin oder Zein sind durch Erepsin zerlegbar (vgl. Tabelle auf S. 261). — Das Erepsin der Pankreasdrüse ist mit dem Erepsin der Darmschleimhaut identisch. „Die Angaben der Literatur, daß durch ereptisches Enzym eine rasche Spaltung der Pepsinpeptone erfolge und daß die aufeinanderfolgende Hydrolyse der Proteine durch Pepsin und durch Erepsin so vollständig sei wie ihr Abbau durch siedende Säuren, sind zu streichen; die zugrundeliegende Beobachtung bezieht sich vielmehr auf die Einwirkung der drei proteolytischen Enzyme von Pepsin, Trypsin und Erepsin“ (l. c. S. 210).

Für eine Verschiedenheit der beiden Fermente, des Darmerepsins und des Pankreaserepsins liegen keine Anhaltspunkte vor.

#### Darstellung.

1. Nach Cohnheim<sup>2)</sup>. Er bediente sich zur Darstellung des Erepsins der fraktionierten Aussalzung mit Ammonsulfat nach Jakoby<sup>3)</sup>. Von frisch entnommenem Darm wird die Schleimhaut abgeschabt, mit Sand verrieben und wiederholt mehrere Stunden mit physiologischer NaCl-Lösung extrahiert. 2 Teile des Darmextraktes werden mit 3 Teilen konzentrierter Ammonsulfatlösung versetzt; es entsteht ein dicker Niederschlag, der abfiltriert, in Wasser suspendiert und dialysiert wird. Eine kleine Menge Eiweiß und das Ferment gehen in Lösung. Den unlöslichen Rückstand kann man nochmals extrahieren.

2. Nach Raubitschek<sup>4)</sup>. Er stellte sich nach Wiechowski Trockenpulver der Schleimhaut her, indem er die mit physiologischer Kochsalzlösung zerriebene, mit Toluol versetzte und durch ein enges Sieb gepreßte Schleimhaut auf Glasplatten strich und bei 34—40° 24 Std. lang trocknen ließ. Die pulverisierte Masse wird dann in der Kälte mit Toluol und Äther extrahiert und wieder bei obiger Temperatur getrocknet, dann daraus das Ferment mit Wasser extrahiert.

<sup>1)</sup> Waldschmidt-Leitz: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 149, S. 203. 1925. Ferner Waldschmidt-Leitz u. Schöffner: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 151, S. 31. 1926.

<sup>2)</sup> Cohnheim: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 33, S. 451. 1901.

<sup>3)</sup> Jakoby: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 30, S. 135. 1900. —

<sup>4)</sup> Raubitschek: Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 4, S. 675. 1907. Vgl. jedoch die Anmerkung auf S. 266.

Trennung von Trypsin und Erepsin nach  
Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup>.

Die Methode beruht auf der verschiedenen Adsorption beider Enzyme durch Tonerde. Nach mehrmaliger, z. B. dreimaliger Wiederholung der Adsorption wird die Mutterlauge frei von Erepsin gefunden, während durch die Elutionen der Adsorbate (mit verdünntem Ammoniak oder besser mit Alkaliphosphat) das Erepsin angereichert wird, ohne daß sich in ihnen tryptische Wirkung nachweisen läßt.

Beispiel einer Trennung von Trypsin und Erepsin<sup>2)</sup>. 22,5 cm<sup>3</sup> Glycerinauszug aus getrockneter Pankreasdrüse wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und nach dem Versetzen mit 1,50 cm<sup>3</sup> n-Acetatpuffer von  $p_h$  4,7 mittels 6,0 cm<sup>3</sup> Tonerdesuspension C (vgl. S. 141) (= 62,4 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) adsorbiert; das Adsorbat wurde mit 45 cm<sup>3</sup> 0,04-n-NH<sub>3</sub> (17<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Glycerin enthaltend) eluiert. Ausbeute an Trypsin in der Mutterlauge 74<sup>0</sup>/<sub>100</sub>, in der Elution 0<sup>0</sup>/<sub>100</sub>; an Erepsin in der Mutterlauge 64<sup>0</sup>/<sub>100</sub>, in der Elution 34<sup>0</sup>/<sub>100</sub>. — <sup>2</sup>/<sub>3</sub> von der Mutterlauge der ersten Adsorption (35 cm<sup>3</sup>) wurden erneut der Behandlung mit 4,0 cm<sup>3</sup> Tonerde (= 41,6 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) unterworfen und das gewonnene Adsorbat wiederum mit 30 cm<sup>3</sup> glycerinhaltigem 0,04-n-NH<sub>3</sub> eluiert. — Ausbeute an Erepsin in der Mutterlauge 54<sup>0</sup>/<sub>100</sub>, in der Elution 47<sup>0</sup>/<sub>100</sub>. — Die Hälfte der Adsorptionslösung von der zweiten Vornahme (19 cm<sup>3</sup>) wurde dann mit 2,0 cm<sup>3</sup> der Tonerde-Aufschlammung (= 20,8 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) behandelt und so der Rest des Erepsins aufgenommen; es hinterblieben nach der Neutralisation 24 cm<sup>3</sup> trypsinhaltige Mutterlauge. Das Adsorbat wurde mit 15 cm<sup>3</sup> Elutionsflüssigkeit eluiert. Die Ausbeute an Trypsin in der Mutterlauge war 94<sup>0</sup>/<sub>100</sub>, in der Elution 0<sup>0</sup>/<sub>100</sub>; an Erepsin in der Mutterlauge 0<sup>0</sup>/<sub>100</sub>, in der Elution 60<sup>0</sup>/<sub>100</sub>. Das verschiedene Adsorptionsverhalten von Pankreaserepsin und Darmerepsin einerseits und Pankreastrypsin andererseits kommt unabhängig von der Natur der begleitenden Stoffe zur Geltung, es ist demnach auf eine verschiedene chemische Orientierung der

<sup>1)</sup> Waldschmidt-Leitz u. A. Harteneck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 147, S. 303. 1925 und Waldschmidt-Leitz: Ebenda Bd. 149, S. 214. 1925.

<sup>2)</sup> Waldschmidt-Leitz u. A. Harteneck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 147, S. 306. 1925. Man beachte aber, daß bei der geringen Beständigkeit des Erepsins die direkte Trocknung der rohen Darmschleimhaut bei der Isolierung des Fermentes unangebracht ist, da diese mit einer fast völligen Zerstörung des Erepsins verbunden ist. Wirksame Fermentlösungen gewinnt man aus der Darmschleimhaut durch Extraktion mit Glycerin oder wasserhaltigem Glycerin. (Waldschmidt-Leitz und Schöffner: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 151, S. 44. 1925.)

enzymatischen Individuen zurückzuführen. Auch durch Kaolin wird das Erepsin bei saurer Reaktion gut adsorbiert.

Eine Vorreinigung der Enzymlösungen mit Essigsäure ist zur Reinigung des Erepsins von Vorteil. Z. B.: 10,0 cm<sup>3</sup> Rohlösung (d. i. mittels Wasser geklärter Glycerinauszug aus Schleimhaut) wurden mit 1,0 cm<sup>3</sup> 0,1-n-Essigsäure gefällt; die mit der Zentrifuge abgetrennte Fällung wurde in 5,0 cm<sup>3</sup> 0,001 n-NH<sub>3</sub> (20% Glycerin enthaltend) gelöst. Diese Lösung enthielt 23% der ursprünglichen Erepsinmenge, während in der Mutterlauge der Fällung 64% verblieben waren<sup>1)</sup>.

#### Nachweis und Bestimmung.

Cohnheim<sup>2)</sup> bediente sich zum Nachweis des Fermentes der Biuretprobe. Eine Peptonlösung wird der Verdauung durch das Ferment unterworfen. Als Pepton verwendete Cohnheim die peptischen Verdauungsprodukte des Muskelfleisches, das wie folgt verarbeitet wurde. Feingehacktes Rindfleisch, von Fett und Sehnen befreit, wird 2 Tage mit warmem Wasser unter Zusatz von Chloroform und Toluol digeriert, das Wasser abgepreßt und der Rückstand wiederholt mit Alkohol und Äther behandelt. 100 g des luft-trockenen Pulvers, das so erhalten wurde, wurden in 2 l 2 proz. Oxalsäurelösung mit 6 g Pepsinum purissimum Grübler versetzt, kräftig geschüttelt, 11 Tage bei 37°, weitere 19 Tage bei Zimmertemperatur der Verdauung überlassen. Man filtriert, befreit das Filtrat von Oxalsäure mit kohlen saurem Kalk, filtriert diesen ebenfalls ab und engt auf ca. 300 cm<sup>3</sup> ein. Die klare Lösung gibt eine schöne, rein rote Biuretreaktion. Nach 24stündiger Einwirkung des Fermentes fällt man die unverändert gebliebenen Eiweißkörper durch Kochen aus und prüft das Filtrat mittels Biuretreaktion, indem die Lösung bei stark alkalischer Reaktion tropfenweise vorsichtig mit ca. 0,1 proz. Kupfersulfatlösung versetzt wird. Mit zunehmender Spaltung wird die Probe immer schwächer und schließlich negativ; in einer unter gleichen Bedingungen angesetzten Kontrollösung mit gekochtem Ferment erhält man die starke Rotfärbung der positiven Biuretprobe<sup>3)</sup>.

Waldschmidt-Leitz führt die Bestimmung des Darm-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 151, S. 47. 1926.

<sup>2)</sup> Cohnheim: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 33, S. 451. 1901.

<sup>3)</sup> Salaskin bestimmte bei seinen Versuchen mit Erepsin stets den N-Gehalt 1. des durch Hitze koagulablen Eiweißes der Gesamtlösung, 2. des Filtrates, 3. den der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen, 4. den des Filtrates der Phosphorwolframsäurefällung. Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 35, S. 419. 1902.

erepsin bei der optimalen Wasserstoffzahl ( $p_h$  7,8) aus. Zugrunde liegt ihr die Einwirkung des Enzyms auf Glycylglycin, dessen Hydrolyse durch die alkalimetrische Messung der freigelegten Carboxyle in 85 proz. methylalkoholischer Lösung verfolgt wird<sup>1)</sup>.

Ausführung der Bestimmung. 0,1320 g Glycylglycin = 0,001 Mol werden in 5,00 cm<sup>3</sup> 0,2 molar. Phosphatpuffer von  $p_h = 7,8$  aufgelöst; die Lösung wird durch Zugabe von 0,2 n-NaOH, deren Menge (gewöhnlich 1,80 cm<sup>3</sup>) in einem Vorversuch nach Zugabe des Fermentes ermittelt wird, auf den gewünschten  $p_h$  von 7,8 gebracht. Nun setzt man die zu prüfende Fermentlösung hinzu und läßt das auf 10,0 cm<sup>3</sup> mit Wasser verdünnte Reaktionsgemisch im Thermostaten von 30°. Nach Ablauf der Versuchsdauer wird die Enzymwirkung durch Eintragen in 130 cm<sup>3</sup> Methylalkohol unterbrochen. Man titriert das Verdauungsgemisch nach Zusatz von 1,0 cm<sup>3</sup> 0,5 proz. Thymolphthalein + 20 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O (also bei einem Methylalkoholgehalt von 85%) mit 0,2 n 90 proz. alkoholischer KOH bis zum Auftreten der ersten schwachblauen Indikatorfärbung (vgl. S. 254). — Man hat zu jeder Bestimmung eine Leeranalyse auszuführen, deren Alkaliverbrauch von dem des Hauptversuchs in Abzug zu bringen ist; der verbleibende Aciditätszuwachs entspricht dann der entstandenen Menge Glykokoll.

Die Fermentmenge ist für eine Bestimmung so zu wählen, daß die (nach dem monomolekularen Verlauf berechnete) Reaktionskonstante zwischen 0,005 und 0,0005 liegt, und die Messung soll nicht über eine 60 proz. Hydrolyse des Peptids ausgedehnt werden.

Als „Erepsin-Einheit“ bezeichnet Waldschmidt-Leitz das 1000fache derjenigen Fermentmenge, für die sich unter den angewandten Bedingungen die Reaktionskonstante 0,001 ergibt; diese selbst drückt also die Anzahl der Erepsineinheiten in der analysierten Probe aus. — Der „Erepsin-Wert“ ist die Anzahl Erepsineinheiten in 1 g des Präparats.

Methode nach Abderhalden<sup>2)</sup>. Abderhalden verwandte zur Erepsinbestimmung synthetische Peptide, die von Trypsin nicht angegriffen werden können. Angewandt wurden d-Alanyl-d-Alanin und d-Alanyl-l-Leucin. Der Nachweis dieses Abbaus von Peptiden kann bequem mittels Polarimetrie bestimmt werden<sup>3)</sup>.

Polarimetrische Methode nach Abderhalden und

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 151, S. 42. 1926.

2) Abderhalden: Fermentforschung Bd. 7, S. 61. 1923.

3) Über die Anwendung der Refraktometrie und Interferometrie zur Verfolgung des fermentativen Abbaus vgl. S. 22, 28.

Koelker<sup>1)</sup>. Sie ließen auf Dipeptide, die die Ebene des polarisierenden Lichtes schwach drehen, das Ferment einwirken, wobei das Dipeptid in einen optisch stärker aktiven Komponenten gespalten wird. Als Substrat dienten d-Alanyl-d-Alanin und d-Alanyl-1-Leucin (letzteres ist weniger geeignet), die nach E. Fischers Vorschrift dargestellt wurden<sup>2)</sup>.

Ihr Polarimeter besaß ein Rohr, das von einem Metallmantel umgeben war, durch das man Wasser einer bestimmten Temperatur leiten konnte; das Innenrohr, das die Verdauungsflüssigkeit enthielt, besaß einen Tubus, durch den man ein Thermometer einführen konnte. Der Tubus gestattete es auch, zur Verhinderung der Fäulnis Toluol aufzuschichten. Nach Einfüllung des Fermentpolypeptidgemisches wird die Drehung sofort abgelesen (bei 37°); in bestimmten Intervallen wird die Ablesung wiederholt.

Beispiele. 0,45 g d-Alanyl-d-Alanin in 6 cm<sup>3</sup> Darmsaft gelöst:

Drehung bei Beginn des Versuches	— 1,38°
nach 8 Stunden	— 1,01°
„ 9 „	— 0,93°
„ 24 „	— 0,13°

Der Darmsaft selbst zeigte eine Drehung von — 0,07°.

0,6 g d-Alanyl-d-Alanin in 5,7 cm<sup>3</sup> Hefepreßsaft + 2,3 cm<sup>3</sup> physiologischer Kochsalzlösung gelöst:

Drehung nach 3 Min.	— 1,23°
7 „	— 1,09°
13 „	— 0,91°
19 „	— 0,72°
26 „	— 0,46°
31 „	— 0,29°
37 „	— 0,11°
39 „	— 0,06°
42 „	— 0,00°
50 „	+ 0,10°

### Gewebsproteasen (Autolyse).

Ein Organ, das aus dem Blutkreislauf ausgeschaltet wird, verdaut sich unter geeigneten Bedingungen selbst; es verfällt der Autolyse.

Zum Nachweis der Autolyse benutzt man entweder den Organpreßsaft oder den Macerationssaft. Nach Salkowski<sup>3)</sup> wird das

<sup>1)</sup> Abderhalden u. Koelker: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 51, S. 294. 1907; Bd. 54, S. 363. 1908. Vgl. auch Abderhalden, E.: Handb. d. biol. Arbeitsmethoden Bd. 5, S. 575. 1911.

<sup>2)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Jg. 40, S. 954. 1907.

<sup>3)</sup> Salkowski: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 63, S. 136. 1909. Vgl. auch Kikkoji, T.: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 63, S. 109. 1909.



vom Blut befreite Organ in einer Fleischmaschine zu einem feinen Brei verrieben und der Brei unter Zusatz von Chloroformwasser (1 Teil Organbrei, 10 Teile Chloroformwasser) im Brutschrank sich selbst überlassen. Das gesättigte Chloroformwasser wird durch Schütteln von 5 cm<sup>3</sup> Chloroform mit 1 l Wasser und nachherigem Filtrieren hergestellt.

Nachweis nach Rona und Mislowitzer<sup>1)</sup>. Sie entnahmen dem frischgetöteten, möglichst entbluteten Tier sofort sterile Leberstückchen, die in steriles Stanniolpapier gewickelt und dann in eine vorbereitete Kältemischung gelegt wurden. Während die Leber gefriert, werden die Pufferlösungen (Phosphat-, Acetat- usw. Puffer zur Herstellung gewünschter H-Ionenkonzentrationen. Das Optimum liegt bei  $p_h$  3,6—3,8) aufgekocht und in sterile Erlenmeyerkölbchen von etwa 50 cm<sup>3</sup> Inhalt getan. Die völlig durchgefrorene Leber wird in kleine Stückchen geschnitten und durch einen sterilisierten Latapie gedreht. Der Leberbrei wird in einem sterilisierten Erlenmeyerkolben von etwa 150 cm<sup>3</sup> aufgefangen; durch Zufügen von sterilem Wasser und gutes Schütteln wird eine gleichmäßige Suspension hergestellt, von der in jedes der obigen Kölbchen eine bestimmte Menge einpipettiert wird. Zum Schluß kommen noch wenige Tropfen Toluol in jedes Kölbchen, die dann in den Brutschrank gestellt werden. Aus diesen Kölbchen werden sofort und dann in bestimmten Zeitabschnitten 2 oder 4 cm<sup>3</sup> entnommen, in ein Becherglas mit 20 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser getan, gegen Neutralrot neutralisiert, dann kurz aufgekocht. Nach erfolgter Koagulation werden 5 cm<sup>3</sup> einer zehnfach verdünnten 5<sup>0</sup>/<sub>10</sub>igen kolloidalen Eisenhydroxydlösung unter starker Bewegung der Flüssigkeit allmählich zugegeben und mit wenigen Tropfen einer gesättigten Lösung von Kaliumsulfat ausgeflockt. Der Inhalt des Becherglases wird dann quantitativ unter Nachspülen mit destilliertem Wasser in einen Meßzylinder gespült und auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Nach einigem Stehen wird durch ein trockenes Filter filtriert und in einem Anteil des Filtrats der N nach der Mikro-Kjeldahlmethode in der Anordnung von Bang (siehe diese) jedoch in der Größenordnung 0,2-0,7 mg N bestimmt (vgl. S. 271).

Dann erfolgte noch eine Bestimmung des „peptidgebundenen“ Stickstoffs mit Hilfe der Säurehydrolyse mit einer vorhergehenden und einer nachfolgenden Amino-N-Bestimmung nach der Folin'schen Methode. (vgl. S. 276).

<sup>1)</sup> Rona u. Mislowitzer: Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 517. 1923; Bd. 146, S. 1 u. 26. 1924.

Die zu analysierenden Rest-N-Mengen wurden in ihrer Größenordnung so bemessen, daß sie stets das 10—20fache des blinden Stickstoffs ausmachten. Der gesamte Reststickstoff war das Maß der Autolyse. Als Reststickstoff wird derjenige N betrachtet, der nach der Hitzeoagulation und Ausfällung aller Kolloide mit Hilfe des kolloidalen Eisenhydroxydes noch in Lösung bleibt. Die Leerbestimmungen, die stets mit allen für die Hauptbestimmungen gebrauchten Lösungen in den richtigen Mengen eingestellt wurden, ergaben 0,015—0,020 mg N.

Um die einzelnen Fraktionen dieses Rest-N genau festzustellen, wurde der Amino-N nach Folin, der  $\text{NH}_3$ -N nach Bang, der Harnstoff-N nach der Ureasemethode bestimmt.

Beispiel für die Anordnung der Versuche: 18,0 g Leberbrei, dazu 125 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser. In 5 cm<sup>3</sup> dieser Suspension sind 1,21 mg „Anfangs“-Rest-N. In je 7 Kolben werden je 10 cm<sup>3</sup> dieser Suspension gegeben, ferner je 10 cm<sup>3</sup> Pufferlösung (in Kolben 1—4 1/15-m-Phosphatgemisch, in Kolben 5—7 1/10-m-Acetatgemisch. Die 7 Kolben kommen für 48 Std. in den Brutschrank (41°); nach 24 und 48 Std. (in der Nähe des Optimums nach kürzeren Zeiten) werden aus jedem Kolben 2 × 2 cm<sup>3</sup> zur Rest-N-Bestimmung entnommen und je 4 cm<sup>3</sup> zur  $p_h$ -Bestimmung.

Ein Versuchsbeispiel für die N-Verteilung:

Leberbrei.  $p_h = 3,9$ , Milchsäurepufferung. Gesamt-N = 12,2 mg.

	Anfangswert		3 Std.		6 Std.		26 Std.	
	mg	% <sup>1)</sup>	mg	%	mg	% <sup>1)</sup>	mg	% <sup>1)</sup>
Gesamt-Rest-N.	0,85	7,0	3,30	27,5	4,71	38,6	6,91	56,6
Amino-N . . .	0,195	1,6	0,62	5,1	1,19	9,8	1,20	9,8
$\text{NH}_3$ -N . . . .	0,10	etwa 1	0,3	2,5	—	—	0,50	4,0
Harnstoff-N . .	0,10	etwa 1	0,105	etwa 1	—	—	0,125	etwa 1

Stickstoffbestimmung nach der Mikro-Kjeldahlmethode in der Anordnung von J. Bang.

Prinzip: Der Stickstoff der organischen Substanz wird durch Kochen mit konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  unter Zusatz von Kaliumsulfat und Kupfersulfat in Ammoniak übergeführt, das von der überschüssigen  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gebunden wird. Durch Zusatz von überschüssigem Alkali wird das Ammoniak freigemacht und mit Wasserdampf in eine titrierte Schwefelsäurevorlage überdestilliert. Die überschüssige  $\text{H}_2\text{SO}_4$  der Vorlage wird zurücktitriert. Durch Aus-

<sup>1)</sup> Prozent vom Gesamt-N.

fällung des koagulablen Eiweiß und Bestimmung des N im Filtrat erhält man den Rest-N. J. Bang gibt folgende Vorschrift zur Bestimmung kleiner N-Mengen nach Kjeldahl<sup>1)</sup>:

Nach Überführung des zu analysierenden Stoffes (am besten in Lösung) in einer Menge, die gewöhnlich einige Hundertstel mg N enthalten darf, in einen gereinigten, 50 cm<sup>3</sup> fassenden langhalsigen Kjeldahlkolben setzt man 1 cm<sup>3</sup> (bei größeren Mengen 2—3 cm<sup>3</sup>) reine konzentrierte H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hinzu, ferner einige Tropfen 10 proz.

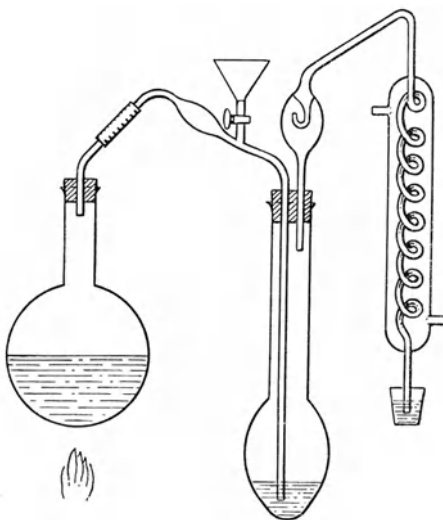


Abb. 68.

Kupfersulfatlösung (als Katalysator). Man erhitzt anfangs vorsichtig, bis alles Wasser verjagt ist, später etwas stärker, bis die Lösung farblos oder rein grüngelb erscheint. Dann läßt man erkalten, setzt etwa 10 cm<sup>3</sup> Wasser hinzu und schüttelt einige Male um, bis sich eine eventuell gebildete Ausscheidung wieder gelöst hat. Inzwischen wird durch den Destillationsapparat (Abb. 68) behufs Reinigung ein Wasserdampfstrom hindurchgeleitet. Ist dies geschehen, so wird ein kleines Spitzglas von etwa 20 cm<sup>3</sup> Inhalt mit 1 cm<sup>3</sup>

1/200-n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (wenn erforderlich mehr) unter das Abflußrohr des Apparates gestellt. Die Spitze des Rohres soll in die Titrierlösung eintauchen.

Der Kjeldahlkolben wird erst, nachdem er gründlich erkaltet ist, mit dem Destillationsapparat verbunden und eine bewegliche Stativplatte darunter befestigt. Nun läßt man Natronlauge (33 proz. ; 3 cm<sup>3</sup>) durch den Trichter vorsichtig einlaufen und stellt die Verbindung des Kjeldahlkolbens mit dem vorher erhitzten Kochkolben her, der mit destilliertem, angesäuertem Wasser dreiviertel voll gefüllt und mit Siedesteinen versehen ist. Die Wasserzuleitung zu dem kleinen Kühler wird vorher geöffnet und möglichst stark gekühlt. Jetzt wird der Brenner unter den Koch-

<sup>1)</sup> Bang, J.: „Mikromethoden“. 2. Aufl. S. 22. 1920.

kolben gestellt und der Inhalt desselben bis zu lebhaftem Sieden erhitzt. Nach 2 Min. langem Sieden senkt man das Spitzglas, bis die Spitze des Abflußrohres leicht zugänglich geworden ist, spritzt diese mittels Spritzflasche ab und prüft mit Lackmuspapier, ob alles Ammoniak übergegangen ist. Ist dies nicht der Fall, so spritzt man das Lackmuspapier in das Spritzglas ab, läßt noch 10 Tropfen übergehen, öffnet die Verbindung zwischen Destillationsapparat und Kochkolben und nimmt dann den Brenner weg. Wird das Lackmuspapier auch dann noch blau gefärbt, so spritzt man es ab und setzt die Destillation fort, wobei die Spitze nicht mehr in die Säure einzutauchen braucht.

Zum Destillat setzt man  $2\text{ cm}^3$  5proz. Kaliumjodidlösung und  $0,1\text{ cm}^3$  — 2 Tropfen — 4proz. Kaliumjodatlösung<sup>1)</sup> und 5 Min. später 2—3 Tropfen Stärkelösung<sup>2)</sup>. Man titriert mit  $1/200$ -n-Thio-sulfatlösung bis farblos ( $1\text{ cm}^3$  Säure =  $0,07\text{ mg N}$ ).

Zur Kontrolle müssen Leerbestimmungen angesetzt werden, bei denen die Anordnung die gleiche ist, wie die beschriebene, nur daß statt der Untersuchungsflüssigkeit destilliertes Wasser benutzt wird.

Nach Folin kann man die Stickstoffbestimmung mittels Durchsaugen von Luft so ausführen, daß man die Apparatur, wie es die Abb. 69 zeigt, benutzt<sup>3)</sup>. Es wird eine Waschflasche mit konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  vorgeschaltet (Abb. links). Die Veraschung geschieht, wie oben beschrieben. Die Vorlage wird wieder mit der abgemessenen Menge  $\text{H}_2\text{SO}_4$  beschickt. Dann wird

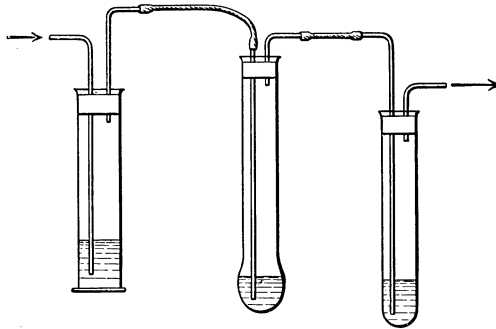


Abb. 69.

<sup>1)</sup> Die Titriersäure kann schon vorher mit dem  $\text{KJO}_3$  versetzt werden: man gibt  $5,0\text{ cm}^3$   $1/10$ -n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $20\text{ cm}^3$   $1/10$ -n- $\text{KJO}_3$  in einen  $100\text{-cm}^3$ -Meßkolben und füllt bis zur Marke auf.

<sup>2)</sup> Die Stärkelösung wird so bereitet, daß  $1\text{ g}$  lösliche Stärke in einem Probierröhrchen mit etwa  $10\text{--}15\text{ cm}^3$  heißem Wasser übergossen wird. Nach Umschütteln erhitzt man vorsichtig über freier Flamme bis alles gelöst ist. Darauf verdünnt man unmittelbar mit gesättigter  $\text{KCl}$ -Lösung auf  $100\text{ cm}^3$ , schüttelt um und filtriert, wenn nötig. Diese Stärkelösung ist haltbar.

<sup>3)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 55, S. 203.

die Saugpumpe angestellt. Man löst die Verbindung zur Waschflasche und gibt durch einen Trichter die 33 proz. NaOH zum Austreiben des  $\text{NH}_3$  zu und verbindet wieder mit der Waschflasche. Die Saugstärke soll 5 Blasen in der Sekunde betragen. Man saugt 1 Std. lang ammoniakfreie Luft durch. Zur Beschleunigung kann man das Reaktionsgefäß in Wasser von  $60^\circ$  stellen, während man die Vorlage mit fließendem Wasser kühlt.

#### Anhang: Enteiweißung.

Nach Schenck<sup>1)</sup>.

Reagenzien: 2 proz. HCl, 5 proz. Sublimatlösung. —  $50 \text{ cm}^3$  eiweißhaltige Flüssigkeit (z. B. Blut) werden mit  $50 \text{ cm}^3$  Wasser vermischt und darauf mit  $100 \text{ cm}^3$  2 proz. Salzsäure und  $100 \text{ cm}^3$  5 proz. Sublimatlösung versetzt. Man filtriert am nächsten Tage, leitet  $\text{H}_2\text{S}$  ein, filtriert wieder und stellt das Volumen fest. Die Entfernung des  $\text{H}_2\text{S}$  erfolgt mittels Durchleiten von Luft.

Mit Trichloressigsäure.

Reagenzien: 12 proz. Trichloressigsäure, Octylalkohol. In ein Meßkölbchen von  $50 \text{ cm}^3$ , worin sich  $25 \text{ cm}^3$  Wasser befinden, werden 7—8  $\text{cm}^3$  Blut (oder eine andere eiweißhaltige Flüssigkeit) unter ständigem Bewegen des Kölbchens gegeben. Man setzt 1—2 Tropfen Octylalkohol zu und unter leichtem Umschütteln langsam 12—13  $\text{cm}^3$  Trichloressigsäure. Die Mischung bleibt 10 Min. lang stehen. Das ausgeflockte Eiweiß wird dann scharf abzentrifugiert.

Mit Natriumwolframat nach Folin und Wu<sup>2)</sup>.

Reagenzien: 10 proz. Natriumwolframat,  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ,  $2 \text{ H}_2\text{O}$ . Das käufliche Salz enthält oft zuviel Soda, 1 g soll nicht mehr als  $0,4 \text{ cm}^3$  n/10-Säure gegen Phenolphthalein verbrauchen. Salze, die gegen Phenolphthalein sauer, gegen Lackmus alkalisch reagieren, eine andere Zusammensetzung haben und schwer löslich sind, werden in der Wärme gelöst, nach dem Abkühlen mit soviel Lauge versetzt, daß Phenolphthalein eben gerötet wird und die Farbe wenigstens 3 Min. lang bestehen bleibt.

$\frac{2}{3}$ -n-Schwefelsäure,  $18,47 \text{ cm}^3$  konzentrierte Säure ( $d = 1,84$ ) auf  $1000 \text{ cm}^3$ .

2-n-Schwefelsäure.

Die abgemessene Blutmenge wird in einem Gefäße vom 15 bis

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 55, S. 203.

<sup>2)</sup> Folin u. Wu: Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 81. 1919, Beschreibung nach Hoppe-Seyler-Thierfelder S. 787.

20fachen Rauminhalt mit dem 7fachen Volumen destillierten Wassers verdünnt — die Pipette wird dabei mit dem Wasser nachgespült —, mit 1 Volumen der Wolframatlösung, dann unter Schütteln mit 1 Volumen  $\frac{2}{3}$ -n-Schwefelsäure versetzt. Nach Verschließen des Gefäßes mit einem Gummistopfen wird einige Male heftig geschüttelt, wobei die Fällung rot- bis dunkelbraun werden muß. Ist dies nicht der Fall, so ist zuviel Oxalat (20 mg sind schon reichlich für 10 cm<sup>3</sup> Blut) oder Citrat (ganz geringe Menge genügt) vorhanden; man setzt dann tropfenweise 2-n-Schwefelsäure zu, schüttelt jedesmal kräftig, läßt einige Minuten absitzen und fährt fort, bis die Koagulation vollständig ist. Die Mischung ist annähernd neutral, 10 cm<sup>3</sup> verbrauchen 0,1—0,2 cm<sup>3</sup> n/10-Lauge. Kongo soll nicht gebläut werden. Mehr als 10 Tropfen Lauge sollen nicht gebraucht werden. Gelingt die Enteiweißung nicht gleich, so verarbeite man lieber eine neue Blutmenge. Man filtriert durch ein Faltenfilter oder die Mischung wird 2—3 Min. im kochenden Wasserbad gehalten und dann zentrifugiert. Man braucht für 10 cm<sup>3</sup> Blut weniger als 1 g Natriumwolframat. Die Fällung ist vollständiger als diejenige durch Trichloressigsäure; sie schließt weder Harnsäure noch Kreatinin, Harnstoff, Aminosäuren und Zucker ein.

Enteiweißung nach Rona und Michaelis mittels kolloidalem Eisenhydroxyd.

Im Blutserum<sup>1)</sup>. 5 cm<sup>3</sup> Blutserum werden auf das 12—14fache mit destilliertem Wasser verdünnt, das Volumen genau notiert und 4 cm<sup>3</sup> Ferrumoxyd. dialysat. (5proz. Liq. ferri oxydati dial., nicht Liq. ferri oxychlorati Pharm. Germ.) tropfenweise unter lebhaftem Schütteln zugegeben und filtriert. Zufügen einer geringen Menge eines Elektrolyten (MgSO<sub>4</sub>, Natriumphosphat) ist von Vorteil. Das wasserklare, eiweiß- und eisenfreie Filtrat kann weiter zur Zuckerbestimmung (nach Bertrand oder Hagedorn-Jensen) benutzt werden.

Im Gesamtblut. Eine abgemessene oder abgewogene Blutmenge (3—4 cm<sup>3</sup> oder 3—4 g) wird mit destilliertem Wasser 15—20fach verdünnt und in dünnem Strahl unter Umschütteln mit der kolloidalen Eisenlösung (5proz.) versetzt (auf 1 g Blut 3—4 cm<sup>3</sup>). Die Mischung bleibt 10 Min. lang stehen, wird dabei häufig geschüttelt, wobei schon reichlich Eiweiß-Eisen ausflockt. Jetzt setzt man ca. 0,1—0,2 g feingepulvertes Magnesiumsulfat oder Kaliumsulfat zu und schüttelt kräftig 1—2 Min. lang. Es

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 332, 1908; Bd. 14, S. 479, 1908.

wird filtriert, wobei das Filtrat klar und farblos sein soll. Ist das Filtrat noch durch Hämoglobin gefärbt, so kann man nochmals wenige Tropfen der Eisenlösung zusetzen. Das wasserklare Filtrat kann, falls nötig, mit wenigen Tropfen Essigsäure angesäuert unter vermindertem Druck bei ca. 45° Wasserbadtemperatur weiter eingeengt werden. Die Enteiweißung mit Eisen kann auch mit der Hitzekoagulation kombiniert werden (vgl. S. 148).

Enteiweißung mittels Kaolin nach Michaelis und Rona<sup>1)</sup>.

5 cm<sup>3</sup> Blutplasma oder Blutserum werden mit der 15fachen Menge Wasser versetzt, mit Essigsäure schwach angesäuert (etwa soweit, bis die anfänglich entstehende Trübung sich wieder aufzuhellen beginnt). Zu der Flüssigkeit, deren Volumen genau festgestellt wird, fügt man dann auf je 100 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit 20—25 g Kaolin in kleinen Portionen unter stetem Umschütteln zu; danach wird abgesaugt. Die Flüssigkeit filtriert leicht und völlig klar. Spuren von Kaolin, die das Filter passieren, entfernt man am besten nach dem Einengen durch Filtrieren. Man engt, falls nötig, im Vakuum nach Feststellung des Volumens ein und führt wieder quantitativ in einen Meßkolben über.

Bestimmung des Aminosäurenstickstoffs nach Folin<sup>2)</sup>.

Prinzip: Die Methode beruht auf der Farbreaktion, die Aminosäuren mit  $\beta$ -Naphthochinonsulfosäure in alkalischer Lösung geben.

Darstellung von  $\beta$ -naphthochinonsulfosäurem Natrium.

Man bringt 100 g  $\beta$ -Naphthol in ein Becherglas von 1 l Inhalt, setzt 300 cm<sup>3</sup> 10 proz. NaOH-Lösung hinzu und rührt mit einem Glasstabe um, bis völlige Lösung erfolgt ist (etwa 10 bis 15 Min.). Dann werden 50—55 g Natriumnitrit in einem Becherglas von 4 l Inhalt mit 600 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und geschüttelt, bis alles gelöst ist (etwa 3—5 Min.). Die alkalische Lösung von  $\beta$ -Naphthol wird in das Becherglas von 4 l Inhalt, das die Nitritlösung enthält, gegossen und mit etwa 100 cm<sup>3</sup> Wasser nachgespült und zu der Mischung von Naphthol und Nitrit werden 800 g zerkleinertes Eis gegeben. Dann werden 200 cm<sup>3</sup> kalter, verdünnter (10 proz.) Schwefelsäure in einem Meßzylinder abgemessen und langsam an der Seitenwand des Becherglases, das die Reaktionslösung enthält, herabgegossen, indem man während des Ein-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 330. 1908.

<sup>2)</sup> Folin: Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 377. 1922. Darstellung nach Mandel-Stuedel: Minim.-Methoden d. Blutuntersuchung. S. 31. Berlin-Leipzig 1924.

gießens kräftig und dauernd mit einem Glasstabe umrührt. Man rührt nach Zusatz der Schwefelsäure noch etwa 1—2 Min. lang. Dann gibt man nochmals 200 cm<sup>3</sup> Schwefelsäure in der gleichen Weise zu und ebenso ein drittes und viertes Mal, bis 800 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verbraucht sind. Die Mischung im Becherglas soll danach eine deutliche und dauernde Reaktion auf Kongopapier geben.

Beim Zusatz der Säure bildet sich ein gelber Niederschlag. Allmählich verwandelt sich die ganze Reaktionsflüssigkeit in eine gelbe Paste. Der Niederschlag muß eine leicht grünliche Färbung haben; ist er ausgesprochen grün, so wird die Ausbeute weniger gut. Man läßt nach dem Zusatz des letzten Quantums Säure 1 Std. lang stehen.

Nun wird durch einen Büchnertrichter von 20 cm Durchmesser unter mäßigem Saugen filtriert und mit etwa 1500 cm<sup>3</sup> kalten Wassers nachgewaschen. Der Niederschlag (Nitroso-Naphthol) wird dann in eine geräumige Abdampfschale gespritzt, 100 g Natriumbisulfit und 50 g Natriumsulfit werden darüber gestreut. Man verrührt gut; der Niederschlag geht in Lösung. Es wird sofort durch eine doppelte Lage Filtrierpapier von einem geringen schwarzen Rückstand abgenutscht und mit wenig Wasser nachgewaschen. Das Filtrat und das Waschwasser werden sofort, um starke Färbung zu vermeiden, in einen 5-l-Kolben gebracht oder in eine weithalsige Flasche aus dunklem Glas, die 2000 cm<sup>3</sup> Wasser und 500 cm<sup>3</sup> konzentrierte Salzsäure enthält. Man bedeckt mit einem Trichter und läßt 36 Std. im Dunkeln stehen. Der Kolben füllt sich mit einem Netzwerk weißer Nadeln, die eine geringe Menge gefärbter Verunreinigungen enthalten, um so mehr, je länger die Lösung dem Licht exponiert war. Man spritzt den Niederschlag (1-Amino-2-Naphthol-4-Schwefelsäure) mit wenig Wasser auf ein großes Stück Filtrierpapier und von da in ein Becherglas von 3—4 l Inhalt. 100 g Natriumnitrat werden darüber gestreut. Nun werden 100 cm<sup>3</sup> konzentrierter Salpetersäure mit 350 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt und die ganze Menge der lauwarmen Flüssigkeit in das Becherglas gegossen. Die Reaktion beginnt sofort unter Entwicklung von Stickoxyd. Ohne zu rühren überläßt man die Flüssigkeit 10 Min. lang sich selbst. Dann rührt man gründlich einige Minuten lang durch und läßt wieder 20—30 Min. stehen.

Tritt keine sichtbare Reaktion auf den Zusatz der Salpetersäure ein, so liegt der Grund dafür möglicherweise in der Gegenwart von Natriumcarbonat in dem benutzten Natriumnitrat. Ist nach einiger Zeit gar keine Reaktion eingetreten, so setze man noch 1—5 cm<sup>3</sup> konzentrierter Salpetersäure hinzu. Nach einer



halben Stunde wird durch eine Saugflasche abfiltriert (Durchmesser der Filtrierfläche 15 cm) und mit etwa 1000 cm<sup>3</sup> 10proz. NaCl nachgewaschen.

Das schwachbraune Produkt auf dem Filter ist das gewünschte Natriumsalz der 1-2-4-Naphthochinonsulfosäure, das noch weiter gereinigt werden muß.

Um das Salz völlig zu reinigen, wird der noch feuchte Niederschlag in eine geräumige Porzellanschale gebracht und mit 200 g gepulvertem Borax und 450 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt. Man mischt mit einem Pistill durch, bis sich alles bis auf wenige Flocken aufgelöst hat; dann wird langsam abgenutscht und mit 100—150 cm<sup>3</sup> Wasser nachgewaschen. Während der Filtration werden 850 cm<sup>3</sup> 95proz. Alkohol und 150 cm<sup>3</sup> konzentrierte Salzsäure in einen Kolben gebracht und unter der Wasserleitung gekühlt. Das Filtrat, in dem das Chinonderivat und Borax gelöst sind, wird in ein Becherglas von 4 l gebracht, dann werden zu dem abgekühlten, salzsauren Alkohol einige Tropfen Brom zugesetzt. Nach Auflösung des Broms wird die Alkohollösung zu der im Becherglas befindlichen Flüssigkeit gegossen und schnell und kräftig einige Augenblicke umgerührt. Man läßt 5 Min. stehen. Nach Ablauf dieser Zeit ist alles Chinonderivat ausgefallen.

Es wird abgenutscht und mit 700—800 cm<sup>3</sup> 10proz. NaCl nachgewaschen und noch einmal, wie oben, umkrystallisiert, nur, daß am Schluß die Waschung mit NaCl-Lösung unterbleibt. Statt dessen wird mit 300—400 cm<sup>3</sup> Alkohol und 200 cm<sup>3</sup> Äther gewaschen.

Zur Probe auf Reinheit dienen folgende Versuche:

Farbe: Man bereite eine 1proz. Lösung des Chinonderivates in Wasser und vergleiche sie mit der Farbe einer 0,5-n-Lösung von Kaliumbichromat, wenn die letztere auf 20 mm im Colorimeter eingestellt ist. Die Chinonderivatlösung muß dann eine Ablesung von 26—27 ergeben.

Gefärbte Zersetzungsprodukte: 2 cm<sup>3</sup> frischbereiteter 1proz. Chinonlösung kommen in ein Reagensglas und werden auf 25 cm<sup>3</sup> verdünnt. Dann setzt man hinzu: 1 cm<sup>3</sup> 50proz. Essigsäure, sodann 1 cm<sup>3</sup> 15proz. Natriumthiosulfatlösung. Die Lösung wird im Laufe weniger Sekunden so ausbleichen, daß man nur eine schwach gelbliche Färbung erkennen kann, wenn man der Länge nach durch das Reagensglas sieht.

Ammoniak: 10 cm<sup>3</sup> der Chinonlösung, wie oben, bringt man in einen kleinen Kolben, setzt etwa 2 g Permutit hinzu und schüttelt langsam etwa 3—4 Min. Man dekantiert und

wäscht mit destilliertem Wasser vier oder fünfmal nach, bis die gelbe Farbe ganz verschwunden ist. Dann setzt man zu dem Permutitpulver einige Tropfen 10proz. Natriumhydroxydlösung, 5 cm<sup>3</sup> Wasser, 5 cm<sup>3</sup> Neßlers Reagens. Es darf keine gelbe Färbung auftreten.

Ferner sind folgende Lösungen erforderlich.

Natriumcarbonatlösung: 50 cm<sup>3</sup> fast gesättigter Sodaauslösung werden auf 500 verdünnt. 20 cm<sup>3</sup> 0,1-n-HCl werden mit dieser Sodaauslösung mit Methylrot als Indicator titriert. Die Sodaauslösung wird nun so verdünnt, daß 8,5 cm<sup>3</sup> 20 cm<sup>3</sup> 0,1-n-HCl entsprechen.

Essigsäure Acetatösung: 100 cm<sup>3</sup> 50proz. Essigsäure mit dem gleichen Volumen 5proz. Na-Acetat verdünnt.

Na-Thiosulfatösung: 4proz. Lösung des kristallisierten Salzes.

Aminosäurevergleichslösung: Eine Lösung von Glykokoll, Leucin, Phenylalanin oder Tyrosin, die 0,07 mg Stickstoff im Kubikzentimeter enthält. Die Aminosäure wird in n/10-HCl gelöst und bis zum gewünschten Volumen aufgefüllt, nachdem man vorher noch 0,2proz. Na-Benzoesäure zugegeben hat. Die Lösung ist unbegrenzt haltbar. Oft wird es zweckmäßig sein, sich eine Vorratslösung herzustellen, die 0,1 mg N im Kubikzentimeter enthält. Glykokoll enthält 18,68% N, man muß also 0,5353 g auf 1000 cm<sup>3</sup> auffüllen, um eine Lösung zu erhalten, die 0,1 mg N in 1 cm<sup>3</sup> enthält.

Ausführung der Bestimmung: 10 cm<sup>3</sup> der zu untersuchenden eiweißfreien Lösung (z. B. Blutfiltrat) kommen in ein großes Reagensglas, das eine Marke bei 25 cm<sup>3</sup> trägt. In ein anderes Reagensglas von gleicher Größe kommt 1 cm<sup>3</sup> der Aminovergleichslösung, darauf in jedes Glas ein Tropfen Phenolphthalein. Zu der Vergleichslösung fügt man nun 1 cm<sup>3</sup> der Sodaauslösung von bekanntem Gehalt, zu der zu untersuchenden Lösung setzt man sie tropfenweise zu, bis sie dieselbe rötliche Farbe hat, wie die Vergleichslösung. Die Vergleichslösung wird zweckmäßig ebenfalls bis auf ca. 10 cm<sup>3</sup> mit destilliertem Wasser verdünnt. Dann kommen 2 cm<sup>3</sup> der frischbereiteten 0,5% Chinonlösung zu jeder Probe; es wird gut umgeschüttelt und bis zum nächsten Tage an einem völlig dunklen Ort stehen gelassen. Am anderen Tage werden zunächst 2 cm<sup>3</sup> Essigsäure-Acetatgemisch und dann 2 cm<sup>3</sup> der Thiosulfatösung zugegeben. Hierdurch wird der Überschuß an Reagens entfärbt. Nun wird bis zur Marke 25 aufgefüllt, umgeschüttelt und im Colorimeter verglichen. Die Vergleichslösung wird auf 20 eingestellt.

Berechnung:  $\frac{\text{Stand der Vergleichslösung}}{\text{Stand der Versuchslösung}} \times 7 = \text{mg Aminosäurestickstoff in } 100 \text{ cm}^3 \text{ Flüssigkeit.}$

### Abwehrfermente.

Im Serum sind ganz spezifische Proteasen beschrieben worden, die in der Norm nicht vorkommen und die in Zusammenhang gebracht werden mit dem Übertreten von körperfremden oder blutfremden Eiweißstoffen ins Blut, die Abwehrfermente Abderhaldens. Von Abderhalden sind verschiedene Verfahren zum Nachweis des proteolytischen Abbaues angegeben worden<sup>1)</sup>. Erwähnt seien hier die folgenden Methoden:

Am einfachsten läßt sich der Abbau nach E. Abderhalden wie folgt zeigen<sup>2)</sup>: Man gibt steriles Serum zu einem gekochten Organsubstrat in ein steriles Röhrchen, verschließt es mit einem sterilen Stopfen und bewahrt es bei 37° auf. Es handelt sich z. B. um Serum einer Schwangeren + Placenta. Das Serum wird schon nach wenigen Stunden trübe; die Trübung nimmt immer zu. Das Substrat quillt auf, wird an seiner Oberfläche durchscheinend und zerfällt oft in kleine Teilchen. Serum von nicht-Schwangeren bleibt klar.

Das Dialysierverfahren. Prinzip: Eiweiß diffundiert nicht durch tierische Membranen hindurch, dagegen sind schon die höheren Abbaustufen dialysierbar. Als Dialysierhülsen werden Schleicher u. Schüll-Hülsen verwendet. Die Prüfung der Abbauprodukte im Dialysat kann mittels der Biuret- oder der Ninhydrinreaktion geschehen. Bei der Biuretprobe gibt man zu den mit Natronlauge durchmischten Dialysaten je 1 cm<sup>3</sup> einer sehr verdünnten wässrigen Kupfersulfatlösung (1 : 500) am besten mit einer Pipette entlang der Wand, so daß eine Übersichtung erfolgt. Bei der Ninhydrinprobe werden die mit 10 cm<sup>3</sup> Dialysat beschickten Reagensgläser mit 0,2 cm<sup>3</sup> einer 1 proz. wässrigen Ninhydrin- (Triketohydrindenhydrat-) Lösung versetzt und (mit einem Siedestab) intensiv 1 Min. gekocht. Sind Eiweißabbauprodukte (Peptone, Aminosäuren) im Dialysat, so entsteht eine Blaufärbung. — Das zu prüfende Organ muß blutfrei, das Serum muß frei von Hämoglobin und von Formelementen sein. Alle

<sup>1)</sup> Genaue methodische Angaben findet man in Abderhalden, E.: Abwehrfermente des tierischen Organismus. 2. Aufl. 1913 und in Abderhalden, E. : „Die Abderhaldensche Reaktion“ 1922. Berlin: Julius Springer.

<sup>2)</sup> Fermentforschung Bd. 5, S. 163. 1921. Med. Klinik, 1921, Nr. 48.

Manipulationen sind unter streng aseptischen und antiseptischen Kautelen durchzuführen.

Die optische Methode. Man gibt in ein Reagensglas 1 cm<sup>3</sup> absolut hämoglobinfreies, steriles Serum, dazu 1 cm<sup>3</sup> einer 5—10proz. Peptonlösung aus dem betreffenden Organ. Man gießt das Gemisch in ein 2 cm<sup>3</sup> fassendes Polarisationsrohr und bestimmt das Drehungsvermögen des Gemisches, nachdem es 37° angenommen hat. Man verfolgt dann das Drehungsvermögen in bestimmten Zeitabschnitten.

Andere Methoden zum Nachweis des Abbaues sind die refraktometrische und die interferometrische (siehe Allgem. Teil S. 22 und 28).

Zum refraktometrischen Nachweis von Abwehrfermenten<sup>1)</sup> verwenden F. Pregl und M. de Crinis nicht trockene Organpräparate, sondern es werden gleiche Mengen Trockenpräparate mittels kochender physiologischer Kochsalzlösung vorgequollen. Nach 1 Std. wird die Salzlösung möglichst vollständig entfernt und dann erst in die Gläschen, in denen die gequollenen Organtrockenpräparate sich befinden, die gleiche Menge Serum (2,3 cm<sup>3</sup>) gegeben, gut durchgeschüttelt, nach 5 Min. der Brechungsindex bestimmt (vgl. Allgem. Teil). Die zweite Messung erfolgt nach 24 Std. — Pregl und de Crinis haben die Methode auch zu einem mikroanalytischen Nachweis der Abwehrfermente ausgearbeitet. In ein kleines Gläschen von 4—6 mm Durchmesser und 3—4 cm Länge werden 0,01 g des Trockenorgans gegeben; das Gläschen wird mit kochender 86 proz. NaCl-Lösung gefüllt, 1 Std. stehen gelassen. Zusatz eines Kryställchens Thymol stört die Bestimmung nicht. Die Kochsalzlösung wird dann möglichst vollständig abgesaugt. Nun läßt man 3—4 Tropfen Serum aus einer frisch ausgezogenen Capillare in das Gläschen einfließen, verschließt es luftdicht mit einem Gummistöpsel und schwenkt gut um. Nach 5—10 Min. zentrifugiert man und entnimmt daraus mit einer neuen Glascapillare ein Tröpfchen, bringt es auf das Hilfsprisma und bestimmt den Brechungsindex. Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur erfolgt die zweite Bestimmung.

Über die Fehlergrenzen der Methode vgl. Kupelwieser<sup>2)</sup>.

Zu dem interferometrischen Nachweis von Abwehrfermenten gibt P. Hirsch<sup>3)</sup> folgende Vorschriften.

<sup>1)</sup> Fermentforschung Bd. 2, S. 58. 1917. Vgl. auch Loewe, F.: Optische Messungen. Steinkopff 1925.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 413. 1922.

<sup>3)</sup> Hirsch, P.: „Die Abderhalden-Reaktion“. Berlin: Julius Springer 1925. Vgl. auch Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 91, S. 440. 1914.

In ein steriles Zentrifugenglas bringt man den Inhalt (5 mg) einer Ampulle Organsubstrat, hierzu kommen 0,5 cm<sup>3</sup> Serum, das vom nüchternen Patienten stammt, vollkommen hämoglobinfrei, nicht chylös und steril sein muß und mit Vuzin versetzt wurde. [Das klare Serum wird mit einer Lösung von Vuzinum hydrochlor. (1:500) in einer Menge versetzt, daß eine Vuzin. hydrochlor.-Konzentration 1:10000 in dem Serum erhalten wird.] Das Gläschen wird mit einem sterilen Gummistopfen luftdicht verschlossen und mit zwei gleichen Röhrchen, die je 0,5 cm<sup>3</sup> des gleichen Serums ohne Substratzusatz enthalten und die als Vergleichsflüssigkeiten dienen, auf 24 Std. in den Brutschrank gesetzt. Sollen mehrere Organe auf Abbau geprüft werden, so sind entsprechend viel Zentrifugiergläschen mit je 5 mg des betreffenden Organsubstrates und je 0,5 cm<sup>3</sup> Serum anzusetzen. Nach Ablauf des 24stündig. Brutschrankaufenthaltes werden sämtliche Röhrchen zwecks Entfernung des Kondenswassers umgeschüttelt, scharf zentrifugiert und die klaren Zentrifugate derart interferometrisch untersucht, daß die mit Substrat aufbewahrten Serumproben gegen die Vergleichsproben unter Benutzung der besonders für diese Untersuchungen angegebenen Mikrokammer nach Hirsch-Löwe ausgemessen werden. Die beiden ohne Substrat aufbewahrten Serumproben werden am Schlusse sämtlicher Messungen gegeneinander ausgemessen. Es darf bei dieser Messung keinerlei Differenz festgestellt werden. Diese Ausmessung dient zur Serumkontrolle, einmal zur Feststellung etwaiger Verdunstung der Vergleichsserumprobe beim Ausmessen der verschiedenen bebrüteten Sera, zum anderen zur Kontrolle für etwaige bakterielle Verunreinigungen. (Vgl. auch S. 28.)

### Proteolytische Pflanzenfermente.

Für die proteolytischen Pflanzenfermente gelten im ganzen dieselben Bedingungen, wie sie bei den Säften tierischer Herkunft beschrieben wurden. Man erhält sie aus Samen (Hafer, Gerste, Pferdebohnen), aus gekeimten Samen, aus Pilzen (Hefe). Besonders wirksam ist die im Handel erhältliche sogenannte Takadiastase, die „ein ganzes Arsenal von Fermenten“ (Neuberg) enthält, ein Produkt des *Aspergillus oryzae*. Auch das Papayotin oder Papain, das sich im Milchsafte, sowie in den Früchten und Blättern von *Carica papaya* (Melonenbaum) findet, enthält proteolytisch gut wirksame Enzyme. (Siehe unten.)

Aus Hafer kann man sich nach Aron u. Klempin<sup>1)</sup> eine wirk-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 163. 1908.

same Proteasenlösung herstellen, indem man den geschroteten Hafer 10—12 Std. in der Kugelmühle in einem Gemisch gleicher Teile Wasser und Glycerin zermahlt, den festen Rückstand in einer festen Filterpresse auspreßt und das ablaufende Filtrat in hohen Zylindern durch Sedimentieren klärt. Die Flüssigkeit wird abgehebert und mehrmals filtriert.

### Papain.

Papain, der eingetrocknete Saft des Melonenbaumes (*Carica papaya* L.), spaltet sowohl native Eiweißkörper als auch bei Behandlung mit Blausäure Peptone, die ohne Blausäurebehandlung nicht angegriffen werden.

Die Beziehungen zwischen der Spezifität des Trypsins und des Papains und der Einfluß der spezifischen Aktivatoren auf diese werden am besten durch folgende Tabelle [Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup>] veranschaulicht.

(Die Angaben bedeuten: — = keine nachweisbare, + = positive, ++ = verstärkte Hydrolyse.)

Enzym	Substrat		
	Gelatine	Pepton	Dipeptid
Trypsin . . . . .	—	+	—
Trypsin + Enterokinase . . .	+	++	—
Papain + Blausäure . . . . .	++	+	—
Papain . . . . .	+	—	—

Das  $p_h$ -Optimum des Papains liegt bei 5 mit einem steilen Abfall nach der sauren Seite hin. Die optimale Temperatur beträgt 65—70° [Willstätter-Graßmann<sup>2)</sup>]. Nach früheren Angaben von C. Delezenne, H. Monton und E. Pozerski soll die Geschwindigkeit der Papainwirkung bei 80—90° ihren Höhepunkt erreichen.

Die Wirkung der Blausäure ist am stärksten, wenn das Ferment mehrere Stunden damit vorbehandelt wird. Die Zahl der abgespalteten COOH-Gruppen (titriert mit alkoholischer Lauge nach Willstätter) steigt dann bis auf den dreifachen Wert gegenüber dem ohne HCN-Behandlung. Durch Vertreibung der Blausäure aus dem Reaktionsgemisch wird das Papain inaktiviert und ist durch erneuten HCN-Zusatz wieder aktivierbar; dieser Vorgang gleicht auch hierin der Trypsinaktivierung durch Enterokinase.

Darstellung: Benutzt wird das Mercksche Präparat. Durch Behandlung mit Blausäure bei 40° werden zuerst die

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 149, S. 212. 1925.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 138, S. 184. 1924.

begleitenden Eiweißkörper abgebaut. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß man z. B. 10 cm<sup>3</sup> 3 proz. Kaliumcyanidlösung mit HCl auf Methylrot neutralisiert, mit 225 mg Papain und 25 cm<sup>3</sup> 1/5-m-Dinatriumcitrat auf 50 cm<sup>3</sup> bei 40° brachte. Davon wurden 10 cm<sup>3</sup> sofort entnommen und mit 2 g Gelatine in 50 cm<sup>3</sup> bei 40° 1 1/2 Std. in Reaktion gebracht; zur Titration dienten 10 cm<sup>3</sup>. Weitere Proben der bei 40° gehaltenen Blausäure-Papainlösung wurden nach 30, 60 usw. Min. entnommen, um unter denselben Bedingungen die Proteolyse zu messen.

Die Beseitigung der Blausäure aus der aktivierten Enzymlösung durch Luftstrom oder Dialyse oder am besten durch Eindampfen der Lösung im Vakuum auf etwa 1/3 hinterläßt das Enzym in nichtaktiviertem, wieder aktivierbarem Zustand.

#### Reinigung durch Alkoholfällung.

Es wurden z. B. 6 g Papain in 400 cm<sup>3</sup> Wasser unter Zusatz von Blausäure entsprechend 1,5 g Blausäure (wasserfrei) 3 Tage lang bei 40° digeriert. Zur Fällung des Papains wurde die Lösung auf eine Alkoholkonzentration von 80% gebracht. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, im Wasser gelöst und im Vakuum von den Resten der Blausäure befreit. Die Lösung enthielt das Papain in 95% der angewandten Menge und fast zweieinhalbfachem Reinheitsgrad.

#### Reinigung durch Adsorption.

Aus ammoniakalischer Lösung wird das Papain von Tonerde adsorbiert, und zwar am besten von Tonerde C (siehe S. 141) aus alkoholischer Lösung. Mit n/20-Essigsäure oder auch durch Wasser kann es aus dem Adsorbat eluiert werden.

1 g Enzym wird von 0,5 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in 250 cm<sup>3</sup> Lösung, die mit Ammoniak genau neutralisiert ist und 45% Alkohol enthält, adsorbiert. Mit 250 cm<sup>3</sup> n/20-Essigsäure, die 30 mg Ammonsulfat zur Vermeidung der Auflösung von Tonerde enthält, wird das Enzym zu 79% des angewandten Anteils eluiert.

Bestimmung: Die abgewogenen Papainmengen werden mit 25 mg Blausäure in 20 cm<sup>3</sup> Volumen vereinigt, entweder so, daß man sofort das Substrat (beste Gelatine) zusetzt und auf 40° erwärmt, oder so, daß man zuerst 2 Std. lang bei 40° die Aktivierung maximal werden läßt (ohne Gelatine). In beiden Fällen wird das Enzym, das auch mit 5 cm<sup>3</sup> m/5-Citratpuffer und Toluol versetzt ist, im 50 cm<sup>3</sup>-Meßkolben mit 30 cm<sup>3</sup> 6,6 proz. Gelatine (2 g) versetzt gewöhnlich bei einer Temperatur von 40°. Je 10 cm<sup>3</sup>

werden zu bestimmten Zeiten in 90% Alkohol enthaltender Lösung mit  $\frac{1}{5}$ -n alkoholischer KOH titriert. Der Alkoholzusatz wird so ausgeführt, daß er als absoluter Alkohol von der Temperatur 50° zugesetzt wird, weil sonst die Gelatine stark klumpt. Als Indicator dient Thymolphthalein (das mit Citrat scharf, mit Phosphatpuffer unscharf umschlägt). Die Ausführung der Titration siehe S. 254.

Beispiele: I. Hydrolyse ohne und mit Blausäure. 3,6 g Gelatine mit 8 cm<sup>3</sup> Acetatpuffer (1 : 1) in 50 cm<sup>3</sup>; zur Titration dienen je 5,0 cm<sup>3</sup>, Temperatur 30°. Die Zahlen bedeuten  $\frac{1}{5}$ -n-KOH.

Enzym	Stunden						Tage	
	$\frac{1}{2}$	1	2	4	8	24	4	8
0,1 g . . . . .	0,08	0,20	0,32	0,40	0,52	0,81	1,21	—
0,2 g . . . . .	0,20	0,32	0,45	0,58	0,78	1,00	1,32	—
0,4 g . . . . .	0,21	0,33	0,49	0,62	0,80	1,02	1,35	—
0,2g u. 10 mg KCN . . . . .	0,62	0,91	1,32	1,75	2,19	2,80	—	4,08

II. Hydrolyse mit Vorbehandlung und ohne Vorbehandlung durch Blausäure.

1. Hydrolyse von 0,4 g Gelatine in 10 cm<sup>3</sup> bei 40° während 2 Std. Aktivierung mit 5 mg Blausäure ohne Vorbehandlung. Citratpuffer ( $p_h = 5,0$ ); gemessen mit  $\frac{1}{5}$ -n-KOH.

Enzymmenge mg für 0,4 g Gelatine in 10 cm <sup>3</sup>	Reaktionsdauer in Stunden			
	$\frac{1}{2}$	1	1 $\frac{1}{2}$	2
2	0,17	0,30	0,50	0,66
4	0,31	0,59	0,76	1,06
10	0,57	0,91	1,23	1,51
15	0,86	1,11	1,50	1,82
20	0,71	1,16	1,52	1,88

2. Derselbe Ansatz wie 1. während 4 Std. mit 2 stündiger Vorbehandlung durch 5 mg Blausäure.

Enzymmenge (mg) 0,4 g Gelatine in 10 cm <sup>3</sup>	Reaktionsdauer in Stunden				
	$\frac{1}{2}$	1	1 $\frac{1}{2}$	2	4
1,25	0,26	0,50	0,66	0,82	1,14
2,5	0,61	0,97	—	1,40	1,77
5	0,87	1,26	1,54	1,77	2,20
10	1,24; 1,22	1,77; 1,68	2,02	2,20	2,62
20	1,50	1,96	—	2,48	2,76



### Amidasen.

Unter diesem Namen sollen hier einige Fermente abgehandelt werden, deren gemeinsames Charakteristicum die Spaltung der Bindungen zwischen Stickstoff und Kohlenstoff ist<sup>1)</sup>.

Über Purinamidasen vgl. S. 297.

### Urease.

Urease ist das Ferment, das die Zerlegung von Harnstoff in  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  katalysiert.

Darstellung (aus Sojabohnen) nach Jakoby u. Sugga<sup>2)</sup>: Sojabohnen werden in der Kaffeemühle zermahlen und, wenn nötig, noch in Mörser zerstoßen. Das Mehl wird in eine große Nutsche gefüllt, deren Abfluß man durch einen Gummischlauch mit Klemme verschließt. Auf das Mehl wird Petroläther aufgegossen, 1 Std. darauf gelassen, dann die Klemme geöffnet und der Äther abgesaugt. Diese Prozedur wird sechsmal wiederholt. Das entfettete Mehl wird auf Glasplatten ausgebreitet, über Nacht lufttrocken gemacht und mit dem fünffachen Volumen Wasser 16—24 Std. in den Eisschrank gestellt. Die obenstehende milchige Flüssigkeit wird abgesaugt oder abzentrifugiert, die erhaltene Flüssigkeit in Schalen mit flachem Boden gegossen und bei Zimmertemperatur im Faust-Heimschen Apparat durch Überleitung eines Luftstromes getrocknet. Das so erhaltene Pulver ist in Wasser fast ganz, wenn auch schwer löslich.

Bestimmung: Zur Bestimmung wird meist die Titration des gebildeten  $\text{NH}_3$  benutzt. Die beste Methode der  $\text{NH}_3$ -Bestimmung ist nach Lövgren die Folinsche Methode (vgl. S. 273), die unten in der Modifikation von Lövgren<sup>1)</sup> beschrieben wird. Zu den anderen Methoden ist zu bemerken, daß nach Lövgren bei höherer Temperatur der Harnstoff selbst durch die schwächsten Basen angegriffen wird. Wegen der dauernden Änderung des  $p_h$  durch das entstehende  $\text{NH}_3$  muß entweder eine sehr starke Pufferung vorgenommen werden oder man muß mit sehr verdünnten Harnstofflösungen arbeiten<sup>3)</sup>.

Prinzip: Das Ammoniak wird durch Alkalikarbonat freigemacht und durch einen, mittels  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ammoniakfrei gewaschenen Luftstrom in die Säurevorlage übergeführt.

Ausführung: Der Reaktionskolben bleibt während des ganzen Versuches mit der Säurevorlage einerseits und mit der Wasch-

<sup>1)</sup> Vgl. Oppenheimer: „Die Fermente“, S. 777.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 69, S. 116. 1914.

<sup>3)</sup> Vgl. Lövgren: Biochem. Zeitschr. Bd. 119, S. 215. 1921; Bd. 137, S. 206. 1923.

flasche mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  andererseits luftdicht verbunden (Abb. 70). Ein schwacher Luftstrom wird dabei stetig mittels einer gewöhnlichen Wasserstrahlpumpe durch die Apparate gesogen. Die Einleitungsrohre sind in ihrem untersten Teil zu einer kleinen Kugel ausgeblasen, in der sich 7 gleichgroße kleine Löcher befinden. Durch den Gummistöpsel des Reaktionskolbens geht ein mit Hahn versehenes Trichterrohr, in das  $40\text{ cm}^3$  einer gesättigten Pottaschelösung gegossen werden. Nach der beabsichtigten Spaltungszeit wird der Hahn geöffnet und, nachdem die Pottaschelösung in die Reaktionsmasse geflossen ist, rasch wieder zugekehrt. Die  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung bricht die Fermentreaktion momentan ab. Eine Viertelstunde später wird der Luftstrom zu seiner vollen Stärke angelassen. Die Zeit der nötigen Durchlüftung ist abhängig von

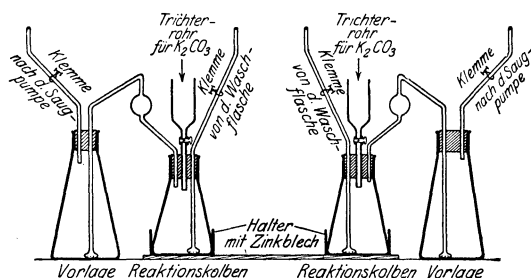


Abb. 70.

Temperatur, Menge des Ammoniaks, Stärke der Base und Stärke des Luftstroms. Nach Ablauf der nötigen Zeit (meistens genügt eine halbe Stunde) wird der Luftstrom vorsichtig abgebrochen, die Säurevorlage freigemacht, das Einleitungsrohr mit destilliertem Wasser abgespült und der Überschuss an Säure in der Vorlage durch  $n/10$ - $\text{NaOH}$  mit Methylrot als Indicator möglichst schnell zurücktitriert. Der Umschlag ist auf  $0,01\text{ cm}^3$   $0,1\text{-n-NaOH}$  ( $= 0,017\text{ mg NH}_3$ ) scharf zu sehen. Das Schäumen wird durch eine Schicht Paraffinöl verhindert.

### Histozym.

Das Ferment katalysiert den Zerfall von Hippursäure in Benzoesäure und Glykokoll. Außerdem wirkt es auf eine Reihe der Homologen. Es wird hauptsächlich aus der Niere von Schwein und Hund dargestellt, findet sich aber auch bei Pilzen [Takadiastase nach Neuberg und Mitarbeitern<sup>1)</sup>].

<sup>1)</sup> Neuberg u. Rosenthal: Ebenda Bd. 145, S. 186. 1923. Neuberg u. Linhardt: Ebenda Bd. 147, S. 372. 1924.

Das Histozyum spaltet außer Hippursäure Acetylglycin,  $\alpha$ -Benzoylalanin, l-Benzoylleucin, d- $\alpha$ -Benzoylaminobuttersäure, ferner Glykokoll- und Taurocholsäure; es spaltet nicht  $\beta$ -Benzoylalanin,  $\beta$ -Benzoylaminobuttersäure, Benzoylaminoisobuttersäure, l- $\alpha$ -Benzolaminobuttersäure (Smorodinzew).

Darstellung nach Smorodinzew<sup>1)</sup>: Das Organ wird möglichst bald nach der Entfernung aus dem Körper durch die Blutgefäße mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült, in der Fleischhackmaschine zerkleinert und 3—4 Tage lang mit 10 Volumina Alkohol extrahiert.

Nach dem Abfiltrieren des Alkohols trocknet man den Rückstand an der Luft, extrahiert ihn im Soxhletschen Apparat mit Äther, pulverisiert und siebt ihn durch ein feines Sieb. Das Organpulver dient als Fermentpräparat.

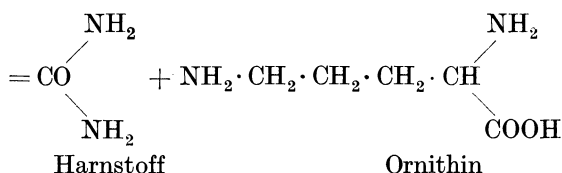
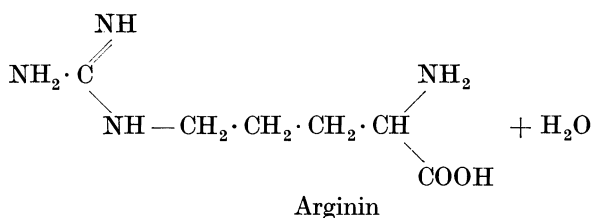
Bestimmung: Eine bestimmte Menge Substrat (meist in 1/20-mol-Lösung) wird mit dem Ferment auf 20 cm<sup>3</sup> gebracht, dazu gibt man 5 cm<sup>3</sup> Toluol. Smorodinzew benutzt 50 cm<sup>3</sup> fassende Kolben aus blauem (Jena-) Glas, verschließt mit einem mit Paraffin übergossenen Pfropfen. Das gut verschlossene Gefäß kommt bei 39° in den Thermostaten und wird öfter umgeschüttelt. Nach einer bestimmten Zeit werden zu jedem Kolben je 5 cm<sup>3</sup> einer 5proz., wässrigen Sublimatlösung zugesetzt; das Ganze wird vorsichtig bis zum Kochen erwärmt. Nachdem die Flüssigkeit abgekühlt ist, filtriert man 20 cm<sup>3</sup> ab, säuert diese Portion mit Salzsäure bis zur Reaktion auf Kongo an und extrahiert sie viermal durch je 5 Min. langes Umschütteln mit 20 cm<sup>3</sup> Petroleumäther (Siedepunkt 60°) im Scheidetrichter. Die 4 Ätherauszüge werden vereinigt, zur Entfernung des Schaumes mit einer kleinen Menge Alkohol versetzt, mit 20 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschen und durch ein trockenes Filter in einen gewogenen Kolben filtriert. Der Äther wird aus dem Kolben mit einem trockenen Luftstrom vertrieben. Der Kolben bleibt über Nacht im Exsiccator. Die Benzoesäure bleibt in Form nadelförmiger Krystalle (Schmelzpunkt 121 bis 122°) zurück und kommt so zur Wägung.

#### Arginase<sup>2)</sup>.

Das Ferment katalysiert den Zerfall von Arginin in Ornithin und Harnstoff nach der Gleichung

<sup>1)</sup> Smorodinzew: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 124, S. 123. 1923. Vgl. auch Neuberg und Noguchi: Biochem. Zeitschr. Bd. 147, S. 370. (Spaltung von Phenacetursäure.)

<sup>2)</sup> Kossel u. Dakin: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 41, S. 321. 1904; Bd. 42, S. 181. 1904.



Guanidinessigsäure und Guanidinpropionsäure werden nicht gespalten. Aus d-l-Arginin spaltet das Ferment l-Arginin ab<sup>1)</sup>, nur die d-Form wird abgebaut. Nach Edlbacher<sup>2)</sup> findet es sich in der Leber der höheren Tiere, es fehlt aber in der Leber von Vögeln und Reptilien. Beim Huhn enthält die Leber männlicher Tiere reiche Mengen Arginase, die von weiblichen meistens keine. Hoden von Hähnen, Taubern, Stier, Hund und Meerschweinchen enthalten reichlich Arginase, Kälberhoden hingegen nur wenig<sup>3)</sup>. Auch in Pilzen und in höheren Pflanzen findet sie sich [Kiesel<sup>4)</sup>]. Hefe sowohl wie Sojabohnen enthalten keine Arginase [Edlbacher<sup>5)</sup>].

Darstellung<sup>6)</sup>. Zur Untersuchung dient meistens Leber-

<sup>1)</sup> Riesser: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 49, S. 210. 1906.

<sup>2)</sup> Edlbacher: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 100, S. 111. 1917.

<sup>3)</sup> Edlbacher, S. u. Bohnen: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 145, S. 69. 1925.

<sup>4)</sup> Kiesel: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 75, S. 169. 1911; Bd. 118, S. 267. 1921.

<sup>5)</sup> Vgl. Edlbacher: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 100, S. 115. 1917.

<sup>6)</sup> Darstellung des Arginins nach Kossel u. Groß (Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 135, S. 167. 1924): Ungefähr 250 g des möglichst gut gereinigten Eiweißstoffes (Edestin aus Hanfsamen, Gelatine) werden durch 18stündiges Kochen mit 33 vol.-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hydrolysiert, der größte Teil der Säure durch Kalk oder Baryt entfernt und die Niederschläge ergiebig ausgewaschen. Den Reaktionsprodukten fügt man eine starke wässrige Lösung der Flaviansäure (ca. 4 Gewichtsteile auf je 1 Gewichtsteil der zu erwartenden Argininmenge) zu. Man läßt die Flüssigkeit 3 Tage an einem kühlen Ort stehen, saugt die Krystallmasse ab, wäscht mit kaltem Wasser nach und bringt den Filtrückstand mit der 2—3fachen Gewichtsmenge Wasser, dem man eine kleine Menge Flaviansäure zugefügt hat, in einen Kolben, um ihn 2 Std. auf dem Wasserbade zu erhitzen. Das nach 24stündigem

preßsaft [z. B. werden 500 g ganz frische Kalbsleber in der Hackmaschine zerkleinert, mit Kieselgur gut verrieben und in der Buchnerpresse bei 300 Atmosphären ausgepreßt]. Statt Leberpreßsaft kann man auch Leberextrakt benutzen, (die feinzerhackte Leber wird mit der vierfachen Menge 0,2proz. Essigsäure extrahiert, 10—20 Std. im Brutofen digeriert, und filtriert), der in feinem Strahl in die zehnfache Menge Aceton eingegossen wird. Der gebildete Niederschlag wird dann auf der Nutsche abgesaugt, mit Aceton, Alkohol und Äther nachgewaschen und im Exsiccator über  $H_2SO_4$  getrocknet. Das so gewonnene Pulver wird fein zerrieben. Es ist im Wasser nicht ganz löslich. Man benutzt 1 Teil Pulver auf 100 Teile Wasser, läßt über Nacht mit einigen Tropfen Toluol auf Eis stehen und filtriert kurz vor dem Versuch. Das Ferment ist auch in wässriger Lösung ziemlich beständig.

Bei ihren Untersuchungen über das Vorkommen der Arginase in verschiedenen Organen verfahren Edlbacher und Bonen so, daß eine bestimmte Menge des zu prüfenden Organs (z. B. 1 g) mit der mehrfachen Menge Quarzsand 5 Min. lang verrieben wurde; mit 50 ccm Wasser wurde dann eine Suspension hergestellt, die nach 5 Min. langem Stehen von den größeren Partikeln abgesehen wurde.

Nachweis: Zum Nachweis wird meistens die Formoltitration (siehe S. 241) des gebildeten Ornithins benutzt. Im Arginin ist nur das  $\alpha$ -N-Atom formoltitrierbar, Harnstoff reagiert nicht, und da Ornithin mit beiden Amidogruppen reagiert, so muß also der doppelte Wert des Formolstickstoffes nach der vollendeten Hydrolyse des Arginins erscheinen.

Beispiel<sup>1)</sup>:

Organ: Kalbslebersuspension. 5 g der ganz frischen Organe

Stehen in der Kälte ausgeschiedene flaviansaure Arginin wird abgenutzt, wie oben gewaschen und dann wie folgt in das Carbonat übergeführt. Das Argininsalz wird mit 33 vol.-proz.  $H_2SO_4$  im Paraffinbad bis zur völligen Lösung gekocht, die nach Abkühlen ausgeschiedene Flaviansäure nach 24 Std. abfiltriert. Die schwefelsauren Lösungen werden mit Tierkohle entfärbt, die farblose Lösung durch Ätzbaryt von  $H_2SO_4$ , durch Kohlensäure vom Baryt befreit und zur Krystallisation des Carbonats stark eingeengt. — Oder man scheidet die Flaviansäure als Baryt ab. Man löst zu diesem Zwecke das in heißem Wasser ausgelaugte flaviansaure Arginin mit Hilfe von etwas  $NH_3$  in einer größeren Menge Wasser bei Wasserbadtemperatur und fügt zu der heißen Flüssigkeit einen Überschuß einer wässrigen warmen Ätzbarytlösung, die die Flaviansäure fast völlig niederschlägt. Um den letzten Rest des Farbstoffs zu entfernen, wird die Flüssigkeit mit  $H_2SO_4$  angesäuert, von einem geringen Niederschlag (unzersetztes Argininflavianat) abfiltriert, mit Tierkohle gekocht. Aus der farblosen Lösung des Argininsulfats wird das Arginin als Carbonat gewonnen. Vgl. auch Pratt, O. E.: Journ. Biol. Chem. Bd. 67, S. 351. 1926.

<sup>1)</sup> Edlbacher: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 95, S. 81. 1915.

wurden zerkleinert, mit Quarzsand verrieben, 25 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser zugesetzt, umgeschüttelt und ca. 10 Min. im Reagensglas absetzen gelassen. Die über dem Bodensatz stehende feine Suspension wurde abgegossen, durchgeschüttelt und je 5 cm<sup>3</sup> davon in kleine Erlenmeyerkolben abpipettiert.

a) Probe	b) Kontrolle
5 cm <sup>3</sup> Suspension	5 cm <sup>3</sup> Suspension
5 „ Argininlösung (mit 10,08 mg formoltitrierbarem N in 10 cm <sup>3</sup> )	5 „ Wasser
2 „ Toluol	2 „ Toluol

6 Std. im Brutschrank digeriert.

5 cm <sup>3</sup> Formolmischung (50 cm <sup>3</sup> Formol + 1 cm <sup>3</sup> 0,5 proz. Phenolphthalein Titration mit $\frac{1}{5}$ -n-NaOH bis zur starken Rotfärbung Verbrauchte $\frac{1}{5}$ -n-NaOH 3,9 cm <sup>3</sup> — 0,6 „	5 cm <sup>3</sup> Formolmischung zur starken Rotfärbung verbrauchte $\frac{1}{5}$ -n-NaOH 0,6 cm
---	---

Differenz 3,3 cm<sup>3</sup> = 9,24 mg Formol-N.

In Prozenten gefunden 185,9<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (Arginin-N = 100<sup>0</sup>/<sub>0</sub>),  
berechnet 200,0<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

Nach 14 stündigem Digerieren 196<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Eine noch weitere Spaltung gelang nicht.

Neuerdings verwenden Edlbacher und P. Bonen<sup>1)</sup> die Urease-Methode zum Nachweis des gebildeten Harnstoffs. Folgendes Beispiel schildert das Verfahren. Je 50 cm<sup>3</sup> einer etwa 2proz. Arginincarbonatlösung werden in je einen Meßkolben von 250 cm<sup>3</sup> gefüllt, mit  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bzw.  $\frac{1}{10}$ -n-NaOH auf den gewünschten  $p_h$  (Optimum der Arginase  $p_h$  = 9,5 bis 9,8) gebracht, mit 100 cm<sup>3</sup> Pufferlösung (z. B. Glykokoll-NaOH) von demselben  $p_h$  und dann mit je 50 cm<sup>3</sup> der Fermentlösung versetzt. (Diese wird so hergestellt, daß je 1 g Fermentpulver mit je 100 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser verrieben wird und nach Zusatz von Toluol nach 12stündigem Stehen im Brutschrank bei 38° filtriert wird.) — Man füllt auf 250 cm<sup>3</sup> auf und kontrolliert den  $p_h$ -Wert. Die Kölbchen kommen nun in den Thermostaten, und man entnimmt zu bestimmten Zeiten Proben von je 20 cm<sup>3</sup>. Das Ferment wird durch kurzes Aufkochen zerstört, nach dem Abkühlen auf  $p_h$  = 7 neutralisiert, Phosphatpuffer von gleichem  $p_h$  (und Toluol) zugesetzt, der gebildete Harnstoff mit Urease zerlegt und das gebildete Ammoniak durch Destillation und Titration bestimmt (vgl. S. 286).

Als Arginaseeinheit (A.E.) wird diejenige Menge Arginase bezeichnet, die aus 10 cm<sup>3</sup> einer 1 proz. Arginincarbonatlösung,

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 145, S. 71. 1925.

die mit 5 cm<sup>3</sup> Glykokoll-NaOH-NaCl auf  $p_h$  9,5 gepuffert ist, bei 38° in 60 Min. so viel Harnstoff bildet, daß bei der Zerlegung durch Urease 0,34 mg NH<sub>3</sub> (= 1 cm<sup>3</sup> 0,02 n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) geliefert werden. Die Genauigkeit der Bestimmung schwankt um  $\pm$  1 A.-E., bei höheren Werten um  $\pm$  3—4 A.-E. — Die genauesten Werte werden zwischen 4—30 A.-E. erhalten<sup>1</sup>).

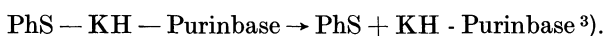
### Nucleasen.

Die Nucleinsäuren, die im Organismus in salzartiger Bindung an Eiweißkörper vorkommen, werden von einer Reihe mehr oder weniger gut bekannter Fermente katalysiert. Die Lösung der Eiweißkomponente wird den bekannten Eiweißfermenten des Verdauungstraktus zugeschrieben. Die Nucleinsäuren sind Phosphorsäureester mit Kohlehydraten der 5- oder 6-C-Reihe, die ihrerseits Purin bzw. Pyrimidinkörper glucosidartig gebunden haben<sup>2</sup>).

Der fermentative Abbau vollzieht sich in mehreren Stufen:

1. Das Polynucleotid wird von Fermenten (Polynucleotidasen oder Nucleinasen) in einfache Nucleotide gespalten, indem die Zwischenverbindungen gelöst werden.

2. Die Nucleotide werden von Phosphatasen gespalten (Nucleotidasen) nach folgendem Schema:



3. Die Puringlucoside werden von Glucosidasen (Nucleosidasen) in ihre beiden Komponenten zerlegt. Bisher sind nur Fermente bekannt, die die Glucoside mit Adenin und Guanin als Paarlinge spalten<sup>4</sup>).

4. Diese Aminopurine werden desaminiert, aus Adenin entsteht dabei Hypoxanthin, aus Guanin Xanthin (Purinamidasen).

5. Ein Teil der Desamidierung vollzieht sich schon vor der Abspaltung des Kohlehydrats, indem aus Adenosin Inosin und aus Guanosin Xanthosin entsteht, die dann weiter hydrolysiert werden<sup>5</sup>).

<sup>1</sup>) Edlbacher u. Röthler: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 148, S. 264. 1925.

<sup>2</sup>) Vgl. hierzu Oppenheimer: Die Fermente. S. 766.

<sup>3</sup>) PhS = Phosphorsäure, KH = Kohlehydrat.

<sup>4</sup>) Vgl. u. a. Levene u. Medigreceanu: Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 65 u. 389. 1911.

<sup>5</sup>) Vgl. Thannhauser u. Ottenstein: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 114, S. 17. 1921.

Weiterhin wird durch eine Xanthinoxydase bei Luftzutritt das Hypoxanthin zu Xanthin und das Xanthin zu Harnsäure oxydiert. Die Harnsäure kann nun wieder durch das urikolytische Ferment weiter abgebaut werden.

Aus diesem Schema ist ersichtlich, daß das früher als „Nuclease“ bezeichnete Ferment ein Gemenge von verschiedenen Teilfermenten ist und daß die bei dem Verfolgen der Wirkung der „Nuclease“ benutzten Verfahren entweder nur Teilvorgänge oder Endprodukte eines komplizierten Reaktionsablaufes erfaßt haben.

Trotzdem sollen hier einige ältere Arbeitsweisen, die sich mit der Spaltung des Nucleinsäuremoleküls befassen, Erwähnung finden.

Aus tierischen Organen erhält man nucleasehaltige Extrakte durch wässrige (mit Toluol resp. Chloroform versetzte) Auszüge (durch Extraktion bei Zimmertemperatur während 1—2 Std.), die koliert und filtriert werden, oder man preßt das Organ mit einer Handpresse oder hydraulischen Presse aus. — Trockenpräparate stellte F. Sachs<sup>1)</sup> wie folgt dar: 570 g Pankreas wurden mit Sand und Kieselgur zerrieben und mit der Buchnerpresse ausgepreßt. Der gewonnene Saft (100 cm<sup>3</sup>) wurde sofort mit Ammonsulfat bis zur Sättigung versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Alkohol und Äther getrocknet. Das so gewonnene Pulver enthält die Nuclease.

Zum Nachweis der Spaltung versetzte Sachs 50 cm<sup>3</sup> Pankreasextrakt mit 50 cm<sup>3</sup> einer 4proz. Lösung des  $\alpha$ -nucleinsäuren Natriums, und ließ 2—3 Tage (mit Toluol) im Brutschrank (37—38°) stehen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gemisch filtriert, das Filtrat zur Beseitigung etwa noch vorhandener Nucleinsäure mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt. Der dabei etwa ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, darauf wurden aus dem Filtrat die Purinbasen mit Quecksilbersulfatlösung<sup>2)</sup> gefällt. Der so entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, in Wasser aufgeschwemmt und unter Zusatz von etwas Salzsäure mit H<sub>2</sub>S zerlegt. Man filtriert, befreit das Filtrat durch Durchleiten von Luft von H<sub>2</sub>S und fällt mit ammoniakalischer Silberlösung<sup>3)</sup>; der entstandene Silberniederschlag wird abfiltriert, gut ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und unter Zusatz von HCl in der Wärme zersetzt. Nach Abfiltrieren des AgCl werden durch das Filtrat einige Blasen H<sub>2</sub>S geleitet und dann wieder filtriert. Das

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 46, S. 337 (348). 1905.

<sup>2)</sup> Diese wird bereitet, indem man 500 cm<sup>3</sup> 15 vol.-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> erhitzt und 75 g Quecksilberoxyd in der heißen Flüssigkeit löst.

<sup>3)</sup> Man löst 26 g Silbernitrat in überschüssigem NH<sub>3</sub> und füllt mit destilliertem Wasser auf 1 l auf.



letzte Filtrat wird zur Abscheidung der Krystalle von salzsauren Purinbasen eingedampft. Die Krystalle wurden mit Alkohol und Äther getrocknet und gewogen.

Tschernoruzki<sup>1)</sup> bestimmt den bei der Spaltung freigesetzten anorganischen Phosphor.

Pighini<sup>2)</sup> hat eine optische Methode vorgeschlagen. Die von ihm verwandte Nucleinsäurelösung wurde so bereitet, daß 1,60 g Nucleinsäure Merck in 100 cm<sup>3</sup> physiologischer Kochsalzlösung (0,85proz.) gelöst und 12 Tropfen Ammoniak (oder 25—30 Tropfen 5proz. NaOH) zugesetzt werden. Von dieser Lösung werden 20 cm<sup>3</sup> mit 2 cm<sup>3</sup> Serum oder einer anderen klaren Fermentlösung versetzt, sofort und nach bestimmten Zeiten polarisiert. Am besten verfolgt man sowohl die Spaltung wie auch die Drehungsänderung bei 37°. — Löst man 2,0 g Nucleinsäure (Boehringer) in 80 cm<sup>3</sup> Wasser unter Zusatz von soviel KOH oder NH<sub>3</sub>, daß gerade deutlich alkalische Reaktion auf Lackmus besteht, und füllt auf 100 cm<sup>3</sup> auf, so ist die Rechtsdrehung im 2-dm-Rohr genau gleich einer 3,0proz. Traubenzuckerlösung. Besonders bequem ist die Anwendung des Boehringerschen nucleinsäuren Natriums, das sich völlig klar in Wasser löst (2proz. Lösung dreht wie eine 2,9proz. Traubenzuckerlösung<sup>3)</sup>).

#### Darstellung von Nucleosidase nach P. A. Levene<sup>4)</sup>.

Die Organe (Milz, Niere, Pankreas [2 kg]) werden frei von Blut gewaschen, zermahlen und mit 4 l  $\frac{1}{7}$ -m-Phosphat nach Sörensen ( $p_h = 7,0$ ) extrahiert. Mittels einer Presse werden die Organe ausgepreßt. Bei Nieren werden die zerkleinerten Organe erst 24 Std. bei 40° der Autolyse überlassen. Der durch ein Nessel-tuch abfiltrierte Saft wird nochmals 24 Std. bei 40° zum gleichen Zweck aufbewahrt. Durch Eisenhydroxyd in alkoholischer Lösung wird das Ferment adsorbiert. Man bringt zu diesem Zweck den Organsaft auf einen Volumenprozentgehalt von 20% Eisenhydroxyd und 20% Alkohol. Der Niederschlag, der hemmende Substanzen enthält, wird abzentrifugiert und das Filtrat nochmals der Eisenhydroxyd-Alkoholbehandlung unterworfen (4 cm<sup>3</sup> Eisenhydroxyd und 1 cm<sup>3</sup> 95proz. Alkohol auf 10 cm<sup>3</sup> Filtrat). Der Niederschlag, der das Enzym enthält, wird wieder abzentrifugiert. Aus dem Adsorbat wird das Enzym durch Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> von  $p_h = 8,76$

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 352. 1912.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 70, S. 85. 1910.

<sup>3)</sup> Neuberger, C.: Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 505. 1911.

<sup>4)</sup> Levene, P. A., M. Yamagawa u. J. Weber: Journ. of biol. chem. Bd. 60, S. 693ff. 1924. — Levene u. Weber: Ebenda S. 707.

oder NaOH von demselben  $p_h$  während 30 Min. eluiert. Diese Behandlung wird nochmals wiederholt. Die Elution wird neutralisiert und unter vermindertem Druck bei 35° C auf ein kleines Volumen konzentriert.

Aus dieser Lösung kann das Enzym durch einen großen Überschuß trockenen Acetons gefällt werden. Das Präzipitat wird schnell an der Saugpumpe filtriert und unter vermindertem Druck über Schwefelsäure oder Calciumchlorid getrocknet. Dieses Präparat behält praktisch über 10 Monate die ganze Aktivität. Es enthält noch gegen 76% Asche. Bei der Dialyse verliert das Präparat seine Wirksamkeit. Eine weitgehende Befreiung von anorganischen Bestandteilen unter Erhaltung der Aktivität gelingt dadurch, daß das Präparat auf einen  $p_h$  von 1,2 gebracht wird. Bei diesem  $p_h$  flockt es als ein leicht filtrierbarer Niederschlag aus. Zu diesem Zwecke werden z. B. 20 g des Präparates in der 10fachen Menge Wasser gelöst und mit HCl (1 : 5) auf einen  $p_h$  von 1,2 gebracht. Der gebildete Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Aceton und trockenem Äther gewaschen und im Vakuum vollends getrocknet.

Bestimmung: Als Substrat dient Adenosin. Der Fortschritt der Hydrolyse des Adenosins wird verfolgt durch Bestimmung der gebildeten Ribose in bestimmten Zwischenräumen.

Ausführung: Beispiel (l. c. S. 701). 0,5 g trockenes Enzym und 0,15 g Adenosin werden in 25 cm<sup>3</sup> Sörensens Phosphatpuffer ( $p_h$  7,5;  $\frac{1}{7}$  mol. Phosphat) gelöst. Als Konservierungsmittel dient Toluol. Wenn die Lösung bei der Temperatur von 37° eine bestimmte Zeit gestanden hat, wird sie in einen 150-cm<sup>3</sup>-Meßkolben gefüllt. Es wird Phosphorwolframsäure bis zur Marke zur Fällung des Adenins zugefügt. Die Fällung bleibt über Nacht im Eisschrank stehen. Dann wird abfiltriert und der Zucker in 60 cm<sup>3</sup> des Filtrats mittels Reduktion bestimmt.

Um einen auf Nucleoside wirksamen Organauszug zu erhalten, sind Thannhauser und Ottenstein<sup>1)</sup> wie folgt verfahren. Möglichst frische, fein zerkleinerte Leber wird in Wasser aufgeschwemmt (auf 800 g Leberbrei 1600 cm<sup>3</sup> dest. Wasser) und 16 Std. turbiniert. Das trübe Filtrat (600 ccm) wird mit 1,5 g Nucleosid (Adenosin, Guanosin oder Xanthosin), das in 300 bis 500 ccm Wasser gelöst wurde, versetzt; dann leitet man (unter Zusatz von 20 ccm Chloroform und einigen Tropfen Oktylalkohol) bei 39° 3 Std. Luft durch. Man enteweiß durch Aufkochen bei schwach essigsaurer Reaktion und gibt noch zur vollständigen Ent-

1) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 114, S. 20. 1921.

eiweißung nach dem Erkalten 1,5proz. kaltgesättigte Uranylacetatlösung (zu 920 ccm Filtrat 370 ccm) hinzu. Nach 12stündigem Stehen wird vom Uranylacetatniederschlag abfiltriert, das Filtrat im Vakuum auf ca. 800 cm<sup>3</sup> eingeengt und die Flüssigkeit zur Isolierung der Nucleoside und Purine nach Krüger-Schmidt gefällt. Zu diesem Zweck wird die Flüssigkeit mit 200 g Natriumacetat und 480 g Natriumdisulfitlösung versetzt, aufgeköcht, zur siedenden Lösung 640 cm<sup>3</sup> 10proz. CuSO<sub>4</sub> zugegeben und 3—4 Min. im Kochen erhalten. Der heißfiltrierte und gewaschene Kupferniederschlag wird (in ca. 500 ccm Wasser) in der Hitze durch H<sub>2</sub>S zerlegt und heiß filtriert.

Die Trennung der freien Purine und der Nucleoside in dem Filtrat geschah durch Fällung der kochenden Flüssigkeit mit heißem bas. Bleiacetat und darauf folgender Fällung des Filtrats mit bas. Bleiacetat und Ammoniak. Die freien Purine sollen sich hierbei im ersten, die Nucleoside in dem ammoniakalischen Bleiniederschlag befinden. Um die Trennung vollständiger zu gestalten, wird das Filtrat von dem mit H<sub>2</sub>S zersetzten ammoniakalischen Bleiniederschlag zur Trockene eingeengt, mit wenig Wasser aufgenommen, und den hierbei ungelöst gebliebenen Teil gibt man zu den aus dem ersten Niederschlag isolierten Purinen zu. Das mit H<sub>2</sub>S zersetzte Filtrat wird im Vakuum auf 200 cm<sup>3</sup> eingeengt (eventuell ausgefallenes Xanthin oder Harnsäure abfiltriert), aufgeköcht, mit heißer Bleiessiglösung so lange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht und noch ca. 30 ccm Bleiessig zugegeben. Der ausfallende Bleiniederschlag enthält im wesentlichen die Purine. Es wird heiß vom Bleiniederschlag abgesaugt, das Filtrat mit ca. 5—10 ccm 25proz. Ammoniak versetzt. Der nunmehr ausfallende Niederschlag soll die Nucleoside enthalten.

Zur Trennung der einzelnen Purine wurde nach Krüger und Salomon das gewichtskonstant gewogene Gesamtpuringemisch zweimal mit 10proz. HCl auf dem Wasserbade abgedampft, die Salzsäure durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser und zweimaliges Abdampfen mit 96proz. Alkohol vertrieben. Das zurückbleibende trockene Pulver wird mit Wasser bei 40° digeriert, über Nacht stehen gelassen, abfiltriert und salzsäurefrei gewaschen. Im Rückstand befinden sich Harnsäure und Xanthin, im Filtrat die eventuell noch vorhandenen anderen Purine.

Zur Trennung der Harnsäure und des Xanthins wird die Harnsäure durch Salpetersäure zerstört und das Xanthin als Nitrat zur Krystallisation gebracht.

Der zweite (die Nucleoside enthaltende) Niederschlag wird in Wasser suspendiert, mit H<sub>2</sub>S versetzt, das Filtrat im Vakuum ein-

geengt und im Exsiccator über  $H_2SO_4$  nahezu vollständig eingedunstet. Hierbei krystallisieren die Nucleoside aus. Das Krystallisat wird in einigen Kubikzentimetern heißen Wassers gelöst, vom Ungelösten (freie Purine) abfiltriert. Aus der Lösung krystallisieren die Nucleoside aus.

Die desamidierenden Fermente (Adenase und Guanase) wurden so gewonnen<sup>1)</sup>, daß der Organbrei (aus Milz, Leber vom Rind) mit der 4—5fachen Menge Wasser und etwas Chloroform 4 Std. verrührt, die durch mehrstündiges Stehen abgesetzte Flüssigkeit koliert, filtriert und zum Versuch verwendet wurde. Man kann auch das Ferment aus dem Organauszug (z. B. Milzextrakt) mit konzentrierter Ammonsulfatlösung aussalzen; am ausgiebigsten ging die Fällung bei einem Sättigungsgrad von 66% vor sich<sup>2)</sup>. Der dabei gewonnene Niederschlag wurde in Wasser (500—800 cm<sup>3</sup>) suspendiert, mit etwas Chloroform versetzt und das Ganze  $\frac{1}{2}$ —1 Std. in die Schüttelmaschine gebracht. Dann wurde so lange gegen fließendes Wasser dialysiert, bis kein Ammoniak mehr nachweisbar war, was meist 6—8 Tage erforderte. Schließlich wurde filtriert und das Filtrat direkt zu den Versuchen benutzt<sup>3)</sup>.

Bei dem Nachweis von Harnsäure in den Gewebsauszügen haben Steudel und Suzuki<sup>4)</sup> diese mit wolframsaurem Natrium nach Folin enteiweißt (z. B. 2830 g Milzbrei mit 2000 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt, dann mit 2830 cm<sup>3</sup> 10proz. Lösung von wolframsaurem Na und 2830 cm<sup>3</sup>  $\frac{2}{3}$ -n- $H_2SO_4$  versetzt). Zu 5 l Filtrat wurden 4 l Folinischer Silberlactatlösung<sup>5)</sup> zugefügt, der Ag-Niederschlag wurde abfiltriert, gewaschen und mit HCl zersetzt. Die Untersuchung ergab, daß auch, wenn man die Enteiweißung in der Kälte vornimmt, in dem Gewebsauszug Körper vorhanden sind, die die Phosphorwolframsäure in alkalischer Lösung reduzieren und so Harnsäure vortäuschen. (Die Folinische Harnsäuremethode ist demnach hier nicht anwendbar.) Ebenso wenig ist nach Steudel die Murexidprobe für Harnsäure beweisend, denn eine ganze Reihe anderer

<sup>1)</sup> Schittenhelm: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 42, S. 254. 1904.

<sup>2)</sup> Ebenda Bd. 43, S. 228. 1904.

<sup>3)</sup> Über Adenase und Guanase vgl. Jones, W. u. M. C. Winternitz: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 44, S. 1. 1905 und Bd. 60, S. 180. 1905; ferner Levene: Americ. Journ. of Physiol. Bd. 12, S. 277.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 119, S. 169. 1922.

<sup>5)</sup> 100 g Silberlactat werden in 700 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Ferner werden zu 100 cm<sup>3</sup> 85proz. Milchsäure 100 cm 10proz. NaOH gegeben, diese Lösung zu der Silberlactatlösung gefügt und auf 1 l aufgefüllt.

Körper der Puringruppe geben solche Farbenreaktionen, besonders wenn sie vorher nicht sehr sorgfältig chlorfrei gewaschen sind. In normalen, frischen Organen findet sich auch keine Harnsäure; erst sekundär werden die primär vorhandenen Nucleinbasen Guanin und Adenin, besonders bei Durchlüftung der Extrakte in Xanthin, Hypoxanthin, endlich in Harnsäure übergeführt<sup>1)</sup>.

Zur Bestimmung der Harnsäure in Organen verfahren His und Hagen<sup>2)</sup> wie folgt. 50—500 g Organbrei werden in großen Kolben mit 2 l Wasser und 10 cm<sup>3</sup> konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 Std. lang so erhitzt, daß die Flüssigkeit niemals ins Sieden kommt. Die Flüssigkeit wird nach 12 stündigem Stehen durch große Faltenfilter filtriert, der Rückstand noch zweimal mit 0,5 vol.-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2—3 Std. in der Wärme extrahiert. Die vereinigten Filtrate werden mit soviel Barythydrat versetzt, als der zugesetzten H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entspricht. Man filtriert, fügt zu dem Filtrat Lithiumcarbonat bis zur neutralen Reaktion hinzu und neutralisiert, während der Niederschlag sich absetzt (am besten bei 30—40°), von Zeit zu Zeit von neuem mit Essigsäure. Eine Probe der überstehenden Flüssigkeit darf weder mit Baryt noch mit Lithiumcarbonat eine Trübung geben. Ist dies eventuell durch nachträglichen Zusatz erreicht, so wird filtriert und mit heißem Wasser mehrfach nachgewaschen. Man dampft das Filtrat ein, filtriert von den ausgeschiedenen Albumosen ab und fällt die Harnsäure als harnsaure Silbermagnesia aus.

Zur Herstellung von wässrigen Extrakten aus Rinderleber, die auf Xanthin gut wirkende Oxydase enthalten, vgl. Burian<sup>3)</sup>.

Zur Darstellung von urikolytischen Fermentlösungen empfiehlt Schittenhelm<sup>4)</sup>, das mit Quarzsand verriebene Organ (z. B. Rinderniere) mit Wasser, und zwar mit der Hälfte des Breivolumens mehrere Stunden zu schütteln und zu kolieren, die Kolatur mit einer gesättigten Lösung von Uranylacetat zu versetzen unter gleichzeitigem Hinzufügen einer Mischung von Natriumcarbonat und Natriumphosphat, so daß die Lösung stets alkalisch bleibt, so viel, bis sich grobe Flocken bilden. Man filtriert, verreibt den Filterrückstand in 500—800 cm<sup>3</sup> 0,2proz. Sodalösung, läßt dann ca. 12 Std. stehen. Das Filtrat enthält das Ferment und kann direkt zum Versuch verwandt werden.

<sup>1)</sup> Vgl. Landmann, G.: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 92, S. 416. 1914.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 30, S. 350. 1900.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 43, S. 497. 1904/05.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 45, S. 161. 1905.

Battelli und Stern<sup>1)</sup> verfahren bei ihren Untersuchungen über Urikase im Tiergewebe wie folgt. Das feinzerriebene Gewebe wird mit 2,5 Volumen leicht alkalisch gemachten Wassers versetzt und während 15 Min. umgerührt. Das Ganze wird durch ein Tuch gepreßt, zentrifugiert; zu der so erhaltenen trüben Flüssigkeit fügt man 2,5 Volumen Alkohol zu. Man zentrifugiert nun sehr schnell (da der Alkohol das Ferment schädigt), wäscht den Bodensatz mit Äther und trocknet ihn an der Luft. Dieses Verfahren liefert sehr gute Resultate bei Benutzung der Pferdeleber oder der Rinderniere. 2—3 g dieses Präparates können in 1 Std. 0,2 g Harnsäure zersetzen, wenn der Versuch in Gegenwart von Luft ausgeführt wird; in reinem Sauerstoff ist die Menge der zersetzten Harnsäure 2—3 mal so groß. — Die in der Leber des Pferdes und der Niere des Rindes enthaltene Urikase läßt sich leicht mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung extrahieren, während die Urikase der Hundeleber zum größten Teil an den Zellen haftet. Die Urikase läßt sich gut 24 Std. lang in schwach alkalisch reagierendem wässerigem Auszuge aufbewahren. Zur Messung der Urikasewirkung bestimmen Battelli und Stern die Menge der bei der Harnsäureoxydation entstandenen Kohlensäure.

Zur Darstellung des bei dem Abbau der Harnsäure entstehenden Allantoins entfernt man nach Wiechowski<sup>2)</sup> aus dem Filtrat der Silberfällung (vgl. S. 297) das überschüssige Silber durch  $H_2S$ , vertreibt den Schwefelwasserstoff und engt die Lösung ein. Falls eine kleine Probe der Lösung mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag gibt, versetzt man die ganze Lösung mit der gerade ausreichenden Menge Phosphorwolframsäure (10proz. Lösung) und läßt mindestens 1 Std. stehen. Dann filtriert man ab, entfernt die überschüssige Phosphorwolframsäure mit der entsprechenden Menge Bleicarbonat, versetzt mit Bleiacetat; das Filtrat von der Bleifällung wird mit  $H_2S$  behandelt, ferner bei Anwesenheit von Chlor die essigsäure Lösung mit Silberacetat versetzt und mit  $H_2S$  behandelt. Zu dem mit chlorfreier NaOH genau neutralisierten Filtrat setzt man von einer 0,5proz. Quecksilberacetatlösung, die mit Natriumacetat gesättigt ist, so viel zu, daß kein Niederschlag mehr entsteht. Der abfiltrierte und mit Wasser gewaschene Niederschlag wird mit  $H_2S$  zersetzt. Aus dem vom Quecksilbersulfid und  $H_2S$  befreiten Filtrat scheidet sich beim Einengen das

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 19, S. 219 (233). 1909.

<sup>2)</sup> Hofmeisters Beitr. Bd. 9, S. 247. 1907 und Bd. 11, S. 109. 1907; vgl. auch Hunter: J. of biol. chem. Bd. 28, S. 371. 1916/1917.

Allantoin in kleinen glänzenden Prismen aus (Schmelzpunkt  $234^{\circ}$  unter Zers.).

### Katalase.

Die Katalase katalysiert den Zerfall von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Wasser und Sauerstoff. Sie findet sich fast in allen pflanzlichen und tierischen Geweben und Flüssigkeiten.

Darstellung von Blutkatalase nach Tsuchihashi<sup>1)</sup>.

15 cm<sup>3</sup> frischgeschlagenen Bluts (angewendet wurde Blut von Kaninchen) werden vom Serum abgetrennt. Blutpulver ist zwar auch brauchbar, es steht aber an Wirksamkeit dem frischen Blute nach. Die Blutkörperchen werden dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, dann von der Waschflüssigkeit abgetrennt und mit destilliertem Wasser bis auf 150 cm<sup>3</sup> aufgefüllt (10%). Die so hämolysierte Blutflüssigkeit wird filtriert, das Filtrat (100 cm<sup>3</sup>) mit 20 cm<sup>3</sup> Chloroform in einen Scheidetrichter von etwa 660 cm<sup>3</sup> Inhalt gebracht und etwa 6 Min. stark geschüttelt. Das Gemisch wird zentrifugiert und die oberstehende Flüssigkeit filtriert. Aus dieser Lösung wird das Ferment mittels frischgefällten dreibasischen Calciumphosphats<sup>2)</sup> zusammen mit dem Hämoglobin adsorbiert. Die Menge des zur Adsorption notwendigen Phosphats muß in Vorversuchen ausprobiert werden, ebenso die nachher zur Elution angewandte Menge m/150-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Z. B. werden 25 cm<sup>3</sup> Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Suspension zentrifugiert, das Wasser dekantiert und der Bodensatz mit 50 cm<sup>3</sup> eines Blutkörperchen-Chloroformauszuges verrührt, nach 10 Min. zentrifugiert und filtriert. Der Niederschlag wird sechsmal mit 50 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser gewaschen und von demselben abgetrennt. Zur Elution wird der Niederschlag mit 50 cm<sup>3</sup> 1/150-m-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> versetzt, während 15 Minuten mehrfach umgerührt und abfiltriert. Die Elution ist wasserklar, gibt mit Sulfosalicylsäure eine ganz schwache Trübung und mit Salpetersäure und Silbernitrat fast keine Trübung mehr.

Darstellung von Leberkatalase nach Battelli und Stern<sup>3)</sup> und Hennichs<sup>4)</sup>.

1) Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 63. 1923.

2) Darstellung des Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> — 7,6 g Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O und 6,57 g CaCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O werden in je 100 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und die beiden Lösungen zusammengegeben. Der Niederschlag wird mit destilliertem Wasser versetzt, gut umgerührt, nach dem Absetzen das Wasser abgesaugt. Dies wird bis zur Cl-Freiheit wiederholt. Dann wird der Niederschlag vom Wasser abzentrifugiert und mit Wasser auf 150 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Diese Suspension ist in einer gut verschlossenen Flasche im Eisschrank mehrere Wochen haltbar.

3) Ergebn. d. Physiol. Bd. 10, S. 544.

4) Biochem. Zeitschr. Bd. 145, S. 286. 1924.

1 kg fein zermahlene Pferdeleber wird mit 1000 cm<sup>3</sup> Wasser extrahiert und durch ein Koliertuch gegeben. Das Filtrat wird mit der doppelten Menge 96 proz. Alkohols bei Gefriertemperatur gefällt. Die Fällung (etwa 40 g) wird an der Luft getrocknet und im Vakuumexsiccator bei Lichtabschluß aufbewahrt. 6 g der Alkohol-fällung werden mit 300 cm<sup>3</sup> Wasser 3 Std. lang geschüttelt, wobei sich 5—10% lösen.

Zur Adsorption wird salzsäurebehandeltes Kaolin (Trockenpulver) — das Kaolin wird mit starker Salzsäure mehrere Stunden gekocht und bis zur negativen Chlorreaktion dekantiert — benutzt. Dabei wurde etwa fünfeinhalbmal soviel Kaolin wie Enzym Trockensubstanz angewandt. Die Adsorption erreichte ihr Maximum bei  $p_h$  5. Das Enzym behält in der Bindung an Kaolin seine Aktivität. Als Eluens kommt Phosphatpuffer zur Anwendung ( $p_h$  7,6). Durch Tonerde wird die Katalase ebenfalls stark adsorbiert.

#### Bestimmungsmethoden.

Als Methoden kommen 1. die Titration des nicht verbrauchten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Permanganatlösung nach der Gleichung  $2 \text{KMnO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}_2 + 4 \text{H}_2\text{SO}_4 = 2 \text{KHSO}_4 + 2 \text{MnSO}_4 + 8 \text{H}_2\text{O} + 5 \text{O}_2$  oder 2. die gasvolumetrische Messung des entwickelten Sauerstoffs in Betracht.

Zu 1. Hennichs macht folgenden Ansatz: Totalvolumen 50 cm<sup>3</sup>, wovon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung, 35 cm<sup>3</sup> einer etwa 0,02-n-Lösung (aus Perhydrol Merck). Puffer: 10 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{30}$ m Phosphat ( $p_h$  6,8), so daß die Reaktionsmischung  $\frac{1}{150}$  molar mit Bezug auf das Phosphat ist; mit Wasser bis zu 50 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Die Menge Enzym wird so bemessen, daß nach 5, 10, 15, 20 und 25 Min. gut bestimmbare Werte zu erhalten sind. Die Temperatur wird durch Eis auf 0° gehalten. Die Wasserstoffperoxydlösung wird täglich etwa gegen 0,005-n-KMnO<sub>4</sub> eingestellt, die wiederum gegen Sörensens Natriumoxalat gestellt wird.

Nach Tsuchihashi (l. c. S. 65): Gesamtvolumen 110 cm<sup>3</sup> Substrat: 100 cm<sup>3</sup> einer  $\frac{1}{100}$ n-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung, die als Puffer 10 cm<sup>3</sup> einer Mischung von  $\frac{1}{15}$  m-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und  $\frac{1}{15}$  m-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> enthält ( $p_h = 7$ ). Alle Lösungen werden in schmelzendem Eis auf ca. 2° abgekühlt. In der Kontrolle werden statt der 10 cm<sup>3</sup> Fermentlösung 10 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer angesetzt. Nach Ablauf der gewünschten Zeit kommen zu jedem Ansatz 20 cm<sup>3</sup> einer 20 proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung. Es wird mit  $\frac{1}{20}$  n-KMnO<sub>4</sub> titriert.

Zu 2. nach Morgulis<sup>1)</sup>. Die entwickelte O<sub>2</sub>-Menge wird in

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Vol. 47, S. 341. 1921.



Eudiometeröhren gemessen. Als Apparatur dient eine Schüttelvorrichtung, auf der die Reaktionsgefäße (Erlenmeyerkolben) befestigt werden. Die Kolben sind durch doppelt durchbohrte Gummikorken verschlossen. Durch die eine Bohrung führt ein kurzes Glasrohr, welches mittels gelenkiger Gummischlauchverbindung mit einem am anderen Ende nach oben aufgebogenen Glasrohr verbunden ist. Das aufgebogene Ende des Glasrohrs taucht in das Eudiometerrohr. Das Eudiometerrohr ist mit Wasser gefüllt und taucht in eine Wasserwanne. Durch die andere Bohrung des Stopfens führt der Hals eines Glassyphons, der zur Aufnahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung dient und der innerhalb der Flasche unter dem Stopfen angebracht ist. Mittels eines sich in dem Hals bewegenden graduierten Stempels kann die gewünschte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge in den Kolben gedrückt werden. Doch ist bei schnellem Arbeiten diese letzterwähnte Einrichtung unnötig. Die entwickelte Gasmenge wird alle 5 Min. registriert und so lange geschüttelt, bis keine Gasentwicklung mehr stattfindet. Das Reaktionsvolumen beträgt gewöhnlich  $50 \text{ cm}^3$ , die Temperatur  $20-21^\circ \text{ C}$ .

Beispiel [nach Rona und Damboviceanu<sup>1)</sup>] zugleich zur Demonstration der Neutralsalzwirkung. Ansätze:  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (3%) je  $50 \text{ cm}^3$  liefert bei  $21,2^\circ$   $750,5 \text{ mm Hg}$   $58,23 \text{ cm}^3 \text{ O}_2$ , Phosphatpuffer je  $2,0 \text{ cm}^3$  (1/3 mol.,  $p_h = 6,85$ ). Fermentlösung  $5,0 \text{ cm}^3$  (1 : 1000), und zwar in folgenden Verdünnungen: in 1. in  $50 \text{ cm}^3$  destilliertes Wasser ( $p_h$  des Gemisches 6,65); in 2. in  $5,0 \text{ cm}^3$  0,154 mol. NaCl-Lösung ( $p_h$  des Gemisches 6,63); in 3. in  $5,0 \text{ cm}^3$  einer Lösung von 0,154 mol. NaCl, 0,0025 mol. KCl und 0,0018  $\text{CaCl}_2$  ( $p_h$  des Gemisches = 6,11); in 4. in  $5,0 \text{ cm}^3$  einer Lösung von 0,154 mol. NaCl, 0,0025 mol. KCl, 0,0018 mol.  $\text{CaCl}_2$ , 0,0011 mol.  $\text{NaHCO}_3$  ( $p_h$  des Gemisches = 6,58). Vor Beginn des Versuches steht das Ferment 30 Minuten in der jeweiligen Lösung.  $p_h$  nach Schluß der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spaltung in allen Röhren 6,9.

Zahlen in der Tabelle:  $\text{cm}^3 \text{ O}_2$  ( $21,2^\circ$  und  $750,5 \text{ mm}$ ).

Nach	1	2	3	4
5 Minuten . . . . .	23,0	9,6	9,8	17,6
10 „ . . . . .	34,4	18,2	17,6	27,2
15 „ . . . . .	41,0	24,6	23,2	34,0
25 „ . . . . .	48,2	30,8	28,6	41,0
30 „ . . . . .	49,6	32,2	29,6	42,8

Die Abb. 71 zeigt die reversible Giftwirkung des KCN auf die Katalase<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 32, Tabelle XXI.

<sup>2)</sup> Rona, Fiegeler u. Nakahara: Biochem. Zeitschr. Bd. 160, S. 272. 1925.

Hennichs schlägt vor, die Wirksamkeit der Katalase anzugeben durch

$$\text{Katf.} = \frac{\text{Reaktionskonstante}}{\text{g Enzympräparat}}$$

### Tyrosinase.

Das Ferment oxydiert Tyrosin (und andere hydroxylierte Benzolderivate) und führt zur Bildung eines dunklen Farbstoffes.

Zum Nachweis des Fermentes wird der Preßsaft oder das wässrige Extrakt des auf Tyrosinase zu prüfenden Materials mit Soda neutralisiert, und dazu ganz wenig Tyrosin gefügt. Bei Anwesenheit der Tyrosinase färbt sich die Lösung (am besten bei Brutschranktemperatur) in wenigen Stunden, beziehungsweise im Verlaufe einiger Tage je nach dem Fermentgehalt orange-gelb bis

dunkelbraun bis schwarz. Statt Tyrosin kann man tyrosinhaltige Polypeptide<sup>1)</sup>, ferner p-Kresol und Adrenalin (1 promillige Lösung) zum Nachweis der Tyrosinase anwenden.

Oft ist es nötig, die Tyrosinasewirkung durch Zusatz von Katalysatoren zu beschleunigen. Hierzu dienen Wasserstoffsperoxyd<sup>2)</sup> (0,5 ccm einer 0,05 proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zu etwa 10 ccm Fermentlösung), ferner Mangansulfat, Ferrosulfat in sehr schwacher Konzentration (zu 0,02 %).

Wirksame Tyrosinaselösungen liefern die Puppen des Wolfmilchschwärmers<sup>3)</sup> (*Deiliphila elpenor* und *euphorbiae*); ferner Mitteldärme hungernder Mehlwürmer<sup>4)</sup> (*Tenebris molitor*) und die

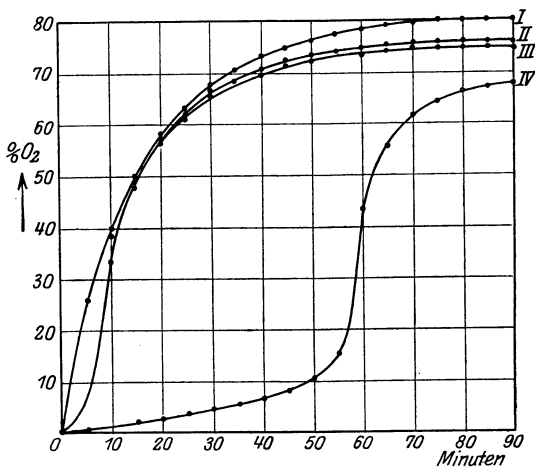


Abb. 71. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Entwickelter Sauerstoff. I KCN 0,001 n. II ohne Salz. III KCl 0,001 n. IV KCN 0,005 n.

<sup>1)</sup> Abderhalden u. Guggenheim: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 54, S. 331. 1907 und Bd. 57, S. 329. 1908.

<sup>2)</sup> Bach: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 41, S. 216. 1908.

<sup>3)</sup> Fürth u. Schneider: Hofm. Beitr. Bd. 1, S. 234. 1902.

<sup>4)</sup> Biedermann: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 72, S. 105. 1898.

Drüse des Tintenfisches. Für pflanzliche Tyrosinasen liefert die Pilzgattung *Russula* das beste Material. Man kann aber auch Kartoffelschalen benutzen.

Zur Bestimmung der Tyrosinase dienen u. a. die Methoden von Bach<sup>1)</sup> und von Raper und Wormall.

Methode von Bach.

Das aus dem Tyrosin gebildete Melanin wird durch Permanganatlösung wieder entfärbt; auf diese Weise kann seine Menge titrimetrisch bestimmt werden.

Man bringt 10 ccm Fermentlösung mit 10 ccm Tyrosinlösung (0,05 g Tyrosin in 100 ccm einer 0,04 proz. Natriumcarbonatlösung durch Erhitzen gelöst) zusammen, gibt 30 ccm Wasser zu und stellt das Gemisch auf 24 Std. in den Brutschrank. Nach Ablauf dieser Frist wird das Gemisch mit 1 ccm 10 proz.  $H_2SO_4$  angesäuert und mit 0,002 n-Permanganatlösung bis zur Entfärbung titriert. Die Permanganatmengen, die zur Entfärbung der ursprünglichen, bräunlich gefärbten Fermentlösung erforderlich sind, werden abgezogen.

Methode von Raper und Wormall<sup>2)</sup>.

Es werden Gemische von Tyrosin-Tyrosinase in gepufferten Lösungen hergestellt, von Zeit zu Zeit Proben entnommen und nach Ausfällung des Melanins und Zerstörung der Tyrosinase die Menge des nicht umgewandelten Tyrosins bestimmt.

Ausführung: Zu 300 ccm einer 0,05 proz. Tyrosinlösung in einem Phosphatpuffer wurden 30 ccm (dialysierter) Kartoffelsaft hinzugefügt, ferner Toluol. Diese Proben wurden im Thermostaten bei 20° gehalten und ein konstanter Luftstrom wurde hindurchgeleitet. Von Zeit zu Zeit wurden 20 ccm der Lösung entnommen, um daran die noch nicht umgewandelte Tyrosinmenge zu bestimmen. Dies geschah auf folgende Weise. Die entnommenen Proben wurden mit 0,5 ccm einer 10 proz. Essigsäure versetzt und aufgeköcht, um das Ferment zu zerstören und das Eiweiß zu koagulieren und um das gebildete Melanin auszuflocken. Die Flasche wurde dann mit Watte verschlossen, 2 Tage stehen gelassen, dann filtriert, der Melaninniederschlag mehrere Mal mit heißem Wasser gewaschen, um alles anhaftende Tyrosin daraus zu entfernen. Dann wurde das Filtrat mit 1 ccm 10 proz. Natriumcarbonat alkalisch gemacht, die Lösung gekocht, die Flasche mit Watte verschlossen,

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 41, S. 216. 1908.

<sup>2)</sup> Biochem. Journ. Bd. 17, S. 454. 1923.

24 Stunden stehen gelassen, um auch die Vorstufen des Melanins in Melanin umzuwandeln; dann wird 1 ccm einer 10 proz. Essigsäure hinzugefügt, die Lösung gekocht, nach einigen Stunden filtriert. Hierauf wurde das Tyrosin nach der Methode von Millar<sup>1)</sup> bestimmt. Von dem so erhaltenen Wert wurde der Wert einer, kein Tyrosin, sondern nur Pufferlösung und Kartoffelpreßsaft enthaltenden Kontrollprobe subtrahiert.

Bestimmung des Tyrosins: Zu jeder Tyrosinlösung wurde 10 ccm  $\text{NaBrO}_3$  (0,0056 molar, 0,8502 g pro Liter; 1 ccm = 0,001527 g Tyrosin), 2 ccm 50 proz. KBr-Lösung und 7,5 proz. 20 proz. HCl-Lösung hinzugefügt, die Flasche verkorkt und 20 Min. stehen gelassen. Hierauf wurden 2 cm 10 proz. KJ hinzugefügt und das freie Jod mit  $\frac{1}{50}$ -n- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung titriert<sup>2)</sup>.

Von anderen Oxydasen seien noch kurz erwähnt.

Die Lakkase<sup>3)</sup>, eine in dem gelben Rindensaft des tonkinesischen Lackbaumes (*Rhus vernicifera*) aber auch in vielen anderen Phanerogamen und Pilzen vorhandene Oxydase, die auf aromatische Verbindungen mit mindestens zwei Hydroxyl- oder Amidogruppen im Kern wirkt.

Bertrand trennt Tyrosinase und Lakkase aus *Russula delica* wie folgt<sup>4)</sup>. *Russula delica* wird mit Chloroformwasser bei Zimmertemperatur extrahiert, der abfiltrierte Extrakt mit Alkohol im Verhältnis von 2 : 3 versetzt. Der dabei entstehende Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat bei einer 50° nicht überschreitenden Temperatur eingeengt. Es enthält die Lakkase und oxydiert Hydrochinon und Pyrogallol kräftig, nicht aber Tyrosin. Der Alkoholniederschlag wird mit Chloroformwasser extrahiert, die Lösung mit Alkohol gefällt und der Niederschlag in Wasser gelöst. Diese Lösung enthält ausschließlich Tyrosinase.

Salicylase<sup>5)</sup>.

Das Ferment katalysiert die Umwandlung von Salicylaldehyd

<sup>1)</sup> Vgl. hierzu Fürth und Fleischmann: Biochem. Zeitschr. Bd. 127, S. 143. 1921.

<sup>2)</sup> 1 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Natriumthiosulfatlösung entsprechen 0,0127 g Jod und 0,0127 g Jod entsprechen 0,002517 g  $\text{NaBrO}_3$ .

<sup>3)</sup> Bertrand: Bull. soc. chim. Serie 3, Bd. 13, S. 361. 1896; Serie 3, Bd. 17, S. 621. 1897.

<sup>4)</sup> Comptes rend. Bd. 123, S. 460. 1896 (nach Wohlgemuth: Fermentmethoden S. 267).

<sup>5)</sup> Salkowski, E.: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 147, S. 1. 1898.

in Salicylsäure. Es ist in Milz, Pankreas, Leber und Lunge und in der Nebennierenrinde des Rindes enthalten.

Der Nachweis beruht darauf, daß Salicylsäure mit Eisenchlorid eine dunkelblaue Farbe gibt, während Salicylaldehyd mit Eisenchlorid nicht reagiert.

Eine Isolierung des Fermentes aus frischer Rinderleber hat M. Jacoby<sup>1)</sup> ausgearbeitet. Der Rinderleberbrei wird mit dest. Wasser (unter Toluolzusatz) extrahiert, der kolierter und filtrierter Extrakt zu 25% mit gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Von Sodalösung wird stets so viel hinzugefügt, daß die Flüssigkeit schwach alkalisch reagiert und deutlich nach Ammoniak riecht. Vom Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat auf 33 $\frac{1}{3}$  proz. Sättigung mit Ammonsulfat gebracht, nach 24 Stunden filtriert, das Filtrat auf 60 proz. Sättigung mit Ammonsulfat gebracht. Der dabei entstehende Niederschlag enthält die Aldehydase. Der Niederschlag wird nach 24 Std. abfiltriert, in destilliertem Wasser aufgenommen, nach einigen Stunden filtriert, das klare Filtrat mit 95 proz. Alkohol versetzt (höchstens bis 30%), bis gerade ein gut abfiltrierbarer Niederschlag entsteht. Der sofort abfiltrierte Niederschlag wird 5—6 mal mit kleinen Mengen dest. Wasser (mit einigen Tropfen verdünnter Sodalösung) extrahiert, die Auszüge werden vereinigt. Um die Lösung von Eiweiß zu befreien, wird sie bei schwach sodaalkalischer Reaktion mit einer verdünnten Lösung von Uranylacetat versetzt; das wasserklare Filtrat oxydiert Salicylaldehyd kräftig zu Salicylsäure.

### Peroxydase aus Meerrettich.

Darstellung von Willstätter und Stoll<sup>2)</sup>. Meerrettich (5 kg) werden quer zur Wurzelachse in Scheiben von 1—1,5 mm Dicke geschnitten, 4—6 Tage gegen fließendes Leitungswasser dialysiert, nachher trockengesaugt, dann in 10 l Wasser, das 40 g krystallisierte Oxalsäure enthält, 4—6 Tage digeriert; dabei wird das Ferment fast quantitativ niedergeschlagen. Die Schnitzel werden dann abgepreßt, zu einem dünnen Brei zermahlen, der Brei wird mit 7 l Wasser vermischt, auf einem Koliertuch abgesaugt und mit Wasser, das zu 1% mit Oxalsäure versetzt ist, gewaschen. Die Masse wird stark abgepreßt und der Preßrückstand mit 1 l  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{2}$  gesättigter Bariumhydroxydlösung verrührt. Nach  $\frac{1}{2}$  stündiger Behandlung mit Barytlösung trennt man den peroxydatisch nur mäßig wirksamen Vorextrakt von dem Preßkuchen.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 30, S. 135. 1900.

<sup>2)</sup> Annalen der Chemie. Bd. 416, S. 21; Bd. 422, S. 47; Bd. 430, S. 269. 1917/18.

Der Preßkuchen wird zur Isolierung des Fermentes von neuem mit  $\frac{1}{4}$  l bei  $20^{\circ}$  gesättigtem Bariumhydroxyd verrieben. Auf diese Weise gewinnt man einen sehr wirksamen Fermentauszug. Dieser wird sofort unter Schütteln in einer Stöpselflasche mit  $\text{CO}_2$  bis zur schwach sauren Reaktion behandelt, dann mit  $\frac{9}{10}$  seines Volumens 96 proz. Alkohol versetzt. Die Peroxydase bleibt dabei in Lösung. Nachdem die Lösung eine Nacht im Eisschrank gestanden hat, läßt sich das Ferment durch eine Schicht von grobem Talk über einem Koliertuch klar absaugen. Diese wässerig-alkoholische Fermentlösung wird im Vakuum bei  $30^{\circ}$  auf  $50\text{--}70\text{ cm}^3$  eingengt, durch eine dünne Talkschiicht filtriert und schließlich die Peroxydase durch Vermischen mit der 5fachen Menge absoluten Alkohols gefällt.

Zur weiteren Reinigung wird das Rohprodukt in etwa der 10fachen Menge Wasser gelöst, mit dem 5fachen Volumen Alkohol gefällt. Vorteilhaft ist es hierbei, die Lösung durch eine geringe Menge Schwefelsäure ganz schwach sauer zu machen.

Zur Isolierung der Peroxydase von einem sie begleitenden N-haltigen Glucosid wird die wässrige Lösung mit Quecksilberchlorid behandelt. So wurden z. B. 7,5 g Rohprodukt in  $150\text{ cm}^3$  Wasser gelöst, zweimal je  $10\text{ cm}^3$  0,5 proz. Quecksilberchloridlösung zugefügt. Die gelatinöse Lösung gab mit  $10\text{ cm}^3$  einer 5 proz. Calciumchloridlösung einen dichten Niederschlag, von dem die bräunliche Fermentlösung durch ein Koliertuch abgesaugt wurde. Das Filtrat wird mit dem 6fachen Volumen Alkohol gefällt, die Suspension abzentrifugiert, das Sediment mit etwas 96 proz. Alkohol aufgeschlemmt, mit  $100\text{ cm}^3$  absolutem Alkohol verdünnt, wieder abzentrifugiert, auf einem gehärteten Filter abgesaugt, in  $20\text{ cm}^3$  Wasser verrieben, vom Ungelösten abzentrifugiert. Das Ferment fällt beim Verdünnen der wässrigen Lösung mit der 6fachen Menge Alkohol in braunen Flocken aus. Man läßt über Nacht bei  $0^{\circ}$  stehen, zentrifugiert und wiederholt das Lösen und Fällen. Schließlich wird die zentrifugierte Fermentlösung im Vakuum eingengt, das Ferment mit dem 6fachen Volumen Alkohol niedergeschlagen, zentrifugiert und der Niederschlag auf einem gehärteten Filter gesammelt.

Eine sehr weitgehende Reinigung des Fermentes gelingt durch wiederholte Adsorption durch Kaolin und Tonerde und Fällung mit Tannin. Der Gang einer solchen Reinigung soll in folgendem Beispiel<sup>1)</sup> skizziert werden. Die Peroxydase (aus Rüben, in dem Beispiel 0,818 g) wird mit Wasser auf 1 l gebracht und mit Essig-

<sup>1)</sup> Willstätter und Stoll: Annalen der Chemie. Bd. 430, S. 269. 1917/18.

säure bis auf 1/50-n versetzt. In die eiskalte Lösung werden in kleinen Anteilen 20 g elektroosmotisch gereinigtes Kaolin eingetragen, das Adsorbat wird rasch abgesaugt, in 600 cm<sup>3</sup> Eiswasser eingetragen. Dann bringt man die Lösung durch langsames Zufügen von n-NH<sub>3</sub> auf 0,1 NH<sub>3</sub>. Die gelbe Elution wird abgesaugt und eingeengt. Diese Lösung wird auf das Volumen von 1 l und 50% Alkohol gebracht und mit Aluminiumhydroxyd (Sorte A, 3,2 g) adsorbiert. Die unter Einleiten von CO<sub>2</sub> gewonnene Elution wird auf 70,5 cm<sup>3</sup> eingeengt. — Die Adsorption mit Aluminiumhydroxyd wie auch die Elution wird wiederholt und dann eine Tanninfällung eingeschoben. Zu diesem Zwecke werden z. B. 29 cm<sup>3</sup> einer, wie oben geschildert, gereinigten Fermentlösung mit 1 proz. Tanninlösung in kleinen Anteilen versetzt, die hellbraune Fällung von der Mutterlauge getrennt, die Tanninfällung in 100 cm<sup>3</sup> Wasser suspendiert, mit 2 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure angesäuert und durch Zusatz von Alkohol (25 cm<sup>3</sup>) vollständig gelöst. Die Lösung wurde dann verdünnt, aus ihr die Peroxydase mit 3 g elektroosmotischem Kaolin entfernt, das Adsorbat mit 0,1 proz. Ammoniak zerlegt. Die mit Essigsäure neutralisierte Elution wurde wieder aus 50 proz. Alkohol mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> adsorbiert. Die Elution wird eingeengt und mit Alkohol gefällt.

Bestimmung der Peroxydasewirkung nach Willstätter und Stoll. Die Fermentreaktion wird in einem Zeitraum von gewöhnlich 5 Minuten bestimmt und dann durch Ansäuern mit Schwefelsäure stillgelegt. Das aus Pyrogallol gebildete Purpurogallin wird ausgeäthert und colorimetrisch ermittelt.

2,01 destilliertes Wasser von 20°, worin 5 g reinstes Pyrogallol gelöst sind, werden im Rundkolben, der sich im Wasserbade von derselben Temperatur befindet, kräftig gerührt. Man trägt etwa 10 cm<sup>3</sup> einer 5 proz. Hydroperoxydlösung (aus Merckschem Perhydrol verdünnt) mit einem Gehalt von genau 50,0 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in die Pyrogallollösung ein und dann im Augenblick des Versuchsbeginns die Peroxydase, z. B. 0,25 mg von dem Rohprodukt bis 0,02 mg des gereinigten Fermentmaterials in Form von 1 bis 5 cm<sup>3</sup> Lösung aus 5 mg Ferment in 100—500 cm<sup>3</sup> Wasser. Nach genau 5 Minuten wird die Reaktion durch Eintragen von 50 cm<sup>3</sup> reiner eisenfreier verdünnter Schwefelsäure unterbrochen und die Lösung ohne längeres Stehen drei- bis viermal erschöpfend ausgeäthert. Die ätherische Lösung (200—500 cm<sup>3</sup>) wird in einem Colorimeter mit einer Vergleichslösung verglichen, die 100 mg aus Alkohol und Äther umkrystallisiertes Purpurogallin im Liter Äther enthält.

Die in irgendeinem Peroxydasepräparat vorhandene Ferment-

menge wird durch die Purpurogallinzahl gemessen, d. h. die Menge Purpurogallin in mg, die von 1 mg Fermentpräparat im Medium von 5 g Pyrogallol + 50 mg  $H_2O_2$  gelöst in 2 l Wasser von 20° in 5 Minuten gebildet wird.

### Die Fermente der Blutgerinnung.

Die Gerinnung des Blutes ist ein Prozeß in mehreren Phasen, dessen erste Phase die Entstehung des Fibrinfermentes des Thrombins [aus Thrombokinase, Thrombogen und Kalksalzen<sup>1)</sup>], die zweite die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin darstellt<sup>2)</sup>.

#### Gewinnung des Nativplasmas.

Das Plasma wird ohne weiteren Zusatz von den Blutkörperchen durch Zentrifugieren mittels paraffinierten Instrumentariums getrennt. Zur Gewinnung von Nativplasma werden durch Punktion der Armvene ohne bzw. mit geringer vorheriger Stauung, die aber vor der Blutentnahme wieder gelöst werden soll, mittels paraffinierter (Paraff. solid. 2 Teile, Paraff. liquid. 1 Teil) Kanüle und Spritze mindestens 4 cm<sup>3</sup> Blut entnommen und in ein paraffiniertes Gläschen nach vorheriger Abnahme der Kanüle und ohne Bildung von Schaum gebracht und sofort mit etwa 2000—3000 Touren 5 Min. zentrifugiert. Das Plasma wird mit paraffinierter Pipette abgehoben<sup>3)</sup>.

#### Gewinnung von Fibrinogenlösungen [Modifikation der Methode von Hammarsten nach Nolf<sup>4)</sup>].

Zur Gewinnung ist Pferdeplasma am geeignetsten; das Blut wird in Na-Oxalatlösung aufgefangen (die Konzentration des Salzes in Blut soll 0,2—0,5% betragen). Das Blut wird scharf abzentrifugiert, das abgehobene, völlig zellfreie Plasma auf 0° abgekühlt und bei niedriger Temperatur filtriert. Das Plasma bleibt bei 0° eine Nacht stehen, wobei ein nucleoproteidhaltiger Niederschlag ausfällt, der Proferment (also wohl Thrombogen und Thrombokinase) enthält, und der entfernt wird. Das eiskalte, filtrierte Plasma wird mit wenig verdünnter Essigsäure gegen Lackmuspapier neutralisiert. Dann wird reines, kalkfreies Kochsalz zugesetzt, bis

<sup>1)</sup> Vgl. jedoch Stüber, F. u. F. Focke: Biochem. Zeitschr. Bd. 154, S. 77. 1924.

<sup>2)</sup> Über die Theorien der Blutgerinnung. Vgl. Oppenheimer: Die Fermente. S. 1178.

<sup>3)</sup> Vgl. hierzu Starlinger: Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 220, 1923.

<sup>4)</sup> Nach Morawitz: Abderhaldens Handb. Bd. 5, S. 254. 1912.



die Flüssigkeit ein spez. Gew. von 1,110 angenommen hat (Halbsättigung). Das Fibrinogen fällt hierbei in großen, sich zusammenballenden Flocken aus. Diese können leicht aus dem Plasma in eine dem Plasma gleiche Menge destillierten Wassers eingetragen werden. Das destillierte Wasser soll eine Spur Na-Oxalat, etwas Kochsalz und 5 cm<sup>3</sup> einer gesättigten Sodalösung enthalten. Man nimmt (namentlich beim Rinderplasma) also die Fällung des Fibrinogens stets bei neutraler, die Lösung bei leicht alkalischer Reaktion vor. Die erste Fällung des Fibrinogens löst sich unter Umrühren meist schnell und vollständig. Vom Ungelösten filtriert man ab. Nun wird die klare, leicht alkalische Flüssigkeit durch vorsichtigen Zusatz verdünnter Essigsäure wieder gegen Lackmus neutralisiert. Bildet sich dabei ein leichter, grobflockiger Niederschlag, so ist sie durch Gaze zu filtrieren. Das Filtrat wird abgekühlt und in derselben Weise mit Kochsalz gefällt wie das Plasma. Der zweite Niederschlag kann, wenn er an Masse gegen den ersten zurücksteht, in etwas weniger Wasser übertragen werden. Man fährt in dieser Weise mit Fällungen und Lösen des Fibrinogens fort. Doch soll das Wasser, in dem man den dritten Niederschlag auflöst, keinen Oxalatzusatz mehr enthalten. Der vierte Niederschlag wird in einer Wassermenge gelöst, die dem 4. Teil der ursprünglichen Wassermenge entspricht. Dem Wasser hat man vorher (5—6 Tropfen auf 300 cm<sup>3</sup>) gesättigte Sodalösung zugesetzt. Man fügt noch soviel NaCl zu, daß die Salzkonzentration ungefähr 1% beträgt. Die Fibrinogenlösung bleibt bis zum nächsten Tage bei 0° stehen und wird durch Leinen kolliert. Aus 1 l Plasma erhält man ungefähr 150—500 cm<sup>3</sup> Fibrinogenlösung. Sie wird zum Versuch mit der 5—10fachen Menge 1proz. NaCl-Lösung verdünnt. Die Lösungen sollen nur auf Zusatz von Thrombin gerinnen.

#### Quantitative Fibrinogenbestimmung nach Starlinger<sup>1)</sup>.

Der Brechungswert von Plasma (Nativplasma oder künstlich schwer gerinnbar gemachtes Plasma) wird refraktometrisch bestimmt, dann das Plasma zur Gerinnung gebracht und der Brechungswert des Serums bestimmt. Die Differenz (eventuell noch unter Abziehung des Brechungswertes der Zusätze) gibt den Fibrinogengehalt.

Die Verwendung von Nativplasma gibt die besten Werte (über Gewinnung siehe oben S. 309). Die Versuchsdauer soll dabei vom Beginn der Blutentnahme an gerechnet 15—20 Min. nicht überschreiten. Das zentrifugierte Plasma wird mit paraffinierter

<sup>1)</sup> Starlinger: Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 203. 1923 (hier auch Beschreibung früherer Methoden).

Pipette abgehoben und nach vorheriger Beschickung des Hilfsprismas in ein frisches Gläschen zur Gewinnung von Serum übertragen. Es empfiehlt sich, während der Refraktometrie des Nativplasmas die Temperatur des Wasserbades in den ersten Minuten tief (etwa auf  $10^{\circ}$ ) zu halten, wodurch eine raschere Abkühlung des eingeschlossenen Plasmas erfolgt, und erst nach 3—4 Min. auf  $17,5^{\circ}$  zu erhöhen. Bei guter Technik, die vor allem in peinlichster Sauberkeit (Staubfreiheit) der zur Verwendung kommenden GefäÙe besteht, gelingt es auf diese Weise fast ohne Ausnahme, die Bestimmung des Brechungsvermögens vor Eintritt der Gerinnung, die in der Regel etwa 15—20' nach Füllung des Refraktometers erfolgt, zu Ende zu führen. Die Umrechnung auf Eiweiß erfolgt unter Zugrundelegung des Verhältnisses: 0,1 Skalenteil des Refraktometers = 0,0215 g-% Eiweiß (Fehlerbereich  $\pm 0,02$  g-%).

Als gerinnungsverhindernder Salzzusatz ist am besten Na-Citrat zu verwenden, das bis zur Konzentration von 0,2 % als Pulver eingetragen wird<sup>1)</sup>. Der Eigenbrechungswert des Salzes ist dann vom Gesamtbrechungswert abzuziehen, und zwar 0,4 Skalenteile der Pulfrichschen Skala pro 0,1 % Salzkonzentration. Zur Gewinnung von Serum wird das Citratplasma 5 Min. auf  $55^{\circ}$  erwärmt, zentrifugiert und das Serum von neuem im Refraktometer untersucht.

Hirudinplasma wird durch Zusatz von Hirudin in Substanz zum Blut gewonnen. Das Hirudin beeinflusst die Brechung nicht. Doch ist zu bemerken, daß das Hirudin in vielen Fällen einen Teil des Fibrinogens irreversibel stabilisiert, d. h. es gelingt weder durch Spontangerinnung noch durch Erwärmen auf  $55^{\circ}$ , diejenige Menge Fibrinogen auszufällen, die man im gleichen Plasma, mit anderer Methodik geprüft, nachweisen kann.

Es ergeben sich aber auch Unterschiede zwischen den Werten des aus dem Salzplasma abgeschiedenen Fibrinogen und des aus Nativplasma gewonnenen. Deshalb ist bei jeder Blutprobe zweckmäßig 1. die Differenz der Werte zwischen Nativplasma und seinem Serum als auch 2. die Differenz zwischen Salzplasma und Salzserum zu bestimmen.

#### Gewinnung des Fermentes (Thrombin).

a) Nach Schmidt<sup>2)</sup>. Man läßt eine bestimmte, nicht zu kleine Blutmenge spontan gerinnen. Sobald Serum abgepreßt ist, wird dieses mit dem 20fachen Volumen 95 proz. Alkohols gefällt.

<sup>1)</sup> Als gerinnungshindernde Salzminima sind für Natriumoxalat 0,1 %, für Natriumfluorid 0,2 %, für Natriumcitrat 0,1—0,2 % anzunehmen.

<sup>2)</sup> Nach Morawitz: Abderhaldens Handb. Bd. 5, S. 275. 1911.

Man kann den Niederschlag so lange unter Alkohol aufbewahren, bis man ihn verwenden will. Zum Versuch wird der Alkohol abfiltriert, der Niederschlag zwischen Filtrierpapier ausgepreßt, getrocknet und mit Wasser oder physiologischer NaCl-Lösung extrahiert. Bei kurzer Extraktion geht neben dem Thrombin nur wenig Eiweiß in Lösung.

b) Nach Howell<sup>1)</sup>. Eine größere, durch Schlagen von Schweineblut gewonnene Fibrinmenge wird in fließendem Wasser bis zur völligen Hämoglobinfreiheit gewaschen. Das erfordert mehrere Stunden und muß von Zeit zu Zeit durch Kneten mit der Hand unterstützt werden. Die weiße Fibrinmasse wird dann möglichst fein zerteilt und für 2—3 Tage im Eisschrank mit 8 proz. Kochsalzlösung extrahiert, dann zuerst durch Gaze, später durch Filtrierpapier filtriert. Das etwas trübe, stark thrombinhaltige Filtrat wird zur Entfernung der Eiweißkörper mehrfach tüchtig mit dem halben Volumen Chloroform durchgeschüttelt und filtriert, wobei der Chloroformniederschlag auf dem Filter bleibt. Diese Prozedur, die man mit der Schüttelmaschine vornehmen kann, ist solange fortzusetzen, wie das Filtrat noch trübe ist oder beim Kochen eine deutliche Fällung gibt. Endlich gewinnt man eine wasserklare, nahezu eiweißfreie Lösung, die immer noch ziemlich viel Thrombin enthält (geprüft mit einer Fibrinogenlösung).

Um dieses Thrombin in einen haltbaren Zustand überzuführen, läßt man geringe Mengen (5—10 cm<sup>3</sup>) bei 35—40° möglichst schnell im Uhrgläschen eintrocknen. In diesem Zustand hält es sich unbeschränkt. Zum Gebrauch wird das Trockenpulver in physiologischer NaCl-Lösung gelöst. Das Thrombin wird aus diesen Lösungen durch Halbsättigung mit Ammonsulfat niedergeschlagen.

c) Vereinfachte Bleibtreu-Atzlersche Thrombindarstellungsmethode von Tsunoo<sup>2)</sup>. Das Thrombin läßt man durch Casein adsorbieren, indem man 1 g Casein in 100 cm<sup>3</sup> Serum im Schüttelapparat auflöst. Darauf wird das Casein durch 30 proz. Essigsäure ausgefällt. Man verdünnt auf das 2—3fache Volumen mit Wasser, dekantiert die obenstehende Flüssigkeit ab, verdünnt wieder auf dasselbe Volumen und filtriert oder zentrifugiert, trocknet dann die Fällung im Exsiccator und pulverisiert. Das getrocknete Pulver wird dann sehr fein zerrieben und in Wasser aufgelöst (10 g Pulver, Wasser 90,0 cm<sup>3</sup>, unter Zusatz von n-NaOH bis zur neutralen Reaktion gegen

<sup>1)</sup> Howell: Americ. Journ. of physiol. Vol. 26, S. 1. 1910 (zit. nach Morawitz: Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden V, Bd. 1, S. 276. 1911.

<sup>2)</sup> Tsunoo: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 205, S. 255. 1924.

Lackmus). Es wird weiter n-NaOH zugesetzt, und zwar 1 Volumen n-NaOH auf 9 Volumina der Lösung. Jetzt wird Wasser zugegeben, und zwar die halbe Menge der Lösung, vermindert um eine hinzuzufügende n-Essigsäuremenge. Die Menge der Essigsäure soll doppelt so groß sein wie die hinzugesetzte n-NaOH-Menge. Nach Zusatz von 94proz. Alkohol (1 Volumen Alkohol auf 3 Volumina Flüssigkeit) läßt man 1 Std. stehen und zentrifugiert 60 Min. stark. Die zentrifugierte Thrombinlösung wird entweder noch an demselben Tage oder nach weiterer Aufbewahrung mit einer geringen Menge n-NaOH (z.B. 0,5 cm<sup>3</sup> auf 15 cm<sup>3</sup> Thrombinlösung) und mit Phosphatpuffer ( $p_h = 6,5$  bis 6,6) versetzt, so daß das Volumen der Lösung auf das Doppelte gebracht wird. Ist beim Aufbewahren ein Niederschlag entstanden, so wird er abzentrifugiert. Die Thrombinlösung kann ohne nennenswerte Einbuße ihrer Wirksamkeit aufbewahrt und später zum Versuch benutzt werden.

#### Bereitung von Thrombokinase nach Morawitz<sup>1)</sup>.

Das Gewebe (Thymus, Lymphknoten, Leber) wird sehr sorgfältig entblutet, gereinigt und zerkleinert. Der Organbrei wird mit der gleichen Kochsalzlösung  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  Std. in der Maschine geschüttelt, die Mischung mehrere Stunden im Eisschrank aufbewahrt und dekantiert. Die trübe aussehende Kochsalzlösung wird direkt zu Gerinnungsversuchen verwendet. Sie verliert beim Aufbewahren ihre Wirksamkeit sehr schnell. Die Kinase bedarf zu ihrer Wirkung der Ca-Ionen.

#### Thrombinbestimmung nach Wohlgemuth<sup>2)</sup>.

Prinzip: Absteigende Mengen Fibrinferment werden mit gleichen Mengen Fibrinogen zusammengebracht und die kleinste Menge Fibrinferment wird ermittelt, die noch imstande ist, in der Fibrinogenlösung ein Gerinnsel zu erzeugen. Die Methode ist in erster Reihe für frische Fermentlösungen, also beispielsweise ganz frisches Serum bestimmt.

Erforderliche Lösungen: 1. Frisches Fibrinferment (frisches Serum), 2. Fibrinogenlösung.

Als solche dient Magnesiumsulfatplasma, das so bereitet wird, daß man 3 Teile frisches Blut mit 1 Teil Magnesiumsulfatlösung (28 proz.) mischt, tüchtig durchschüttelt und durch scharfes

<sup>1)</sup> Abderhaldens Handb. Bd. 5, 1. Teil, S. 278. 1911.

<sup>2)</sup> Wohlgemuth: Fermentmethoden S. 320. Berlin 1913. Biochem. Zeitschr. Bd. 25, S. 79. (1910).

Zentrifugieren das Plasma von den Blutkörperchen trennt. Dieses Plasma hält sich im Eisschrank wochenlang, ohne seinen Gehalt an Fibrinogen wesentlich zu ändern. Zu dem Versuch wird eine 10fache Verdünnung desselben verwandt, die man sich für jeden Versuch unter Benutzung von 1 proz. NaCl-Lösung frisch aus dem Plasma bereiten muß.

### 3. 1 proz. kalkfreie Kochsalzlösung.

**Ausführung:** Eine Reihe mit fortlaufenden Zahlen versehener Reagensgläser wird mit absteigenden Mengen der zu untersuchenden Thrombinlösung beschickt, und zwar in der Weise, daß man in das erste Gläschen 1,0 cm<sup>3</sup>, in das zweite 0,5 cm<sup>3</sup>, in das dritte 0,25 cm<sup>3</sup>, in das vierte 0,125 cm<sup>3</sup> usw. bringt und daß für die hierbei notwendigen Verdünnungen ausschließlich 1 proz. Kochsalzlösung verwandt wird. Hiernach werden je 2 cm<sup>3</sup> der verdünnten Fibrinogenlösung zu jedem Gläschen zugefügt, die Gläschen durchgeschüttelt und auf 24 Std. in den Eisschrank gestellt. Während dieser Zeit geht die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin in den einzelnen Gläschen nach Maßgabe der jeweils vorhandenen Fibrinfermentmenge vor sich. Nach Ablauf der Frist nimmt man die Gläschen aus dem Eisschrank heraus und stellt nun, ohne zu schütteln, nur durch vorsichtiges horizontales Neigen eines jeden Röhrchens fest, wo eine Gerinnung stattgefunden hat und wo nicht.

### Methoden zur Bestimmung der Gerinnungszeit.

**Vorbemerkungen:** Bei den allermeisten Methoden wird die Zeit bis zum ersten Eintreten sichtbarer Gerinnungserscheinungen gemessen. Diese Methoden haben alle den unvermeidbaren Fehler der weitgehend willkürlichen Festsetzung dieses Punktes. Weiter ist der Gerinnungseintritt nicht unabhängig von der Temperatur und von der Vorbehandlung des Blutes (Berührung mit Fremdkörpern, CO<sub>2</sub>-Gehalt, Vermischung des Blutes mit Gewebssaft).

#### Methode von Fuld<sup>1)</sup>.

**Prinzip:** In einem U-förmigen Glasröhrchen wird eine Schrotkugel durch Pendelbewegung innerhalb des Blutes hin- und hergeschleudert. Die Zeit von der Gewinnung des Blutes bis zum Aufhören der Bewegung der Kugel infolge der Gerinnung wird gemessen.

**Apparatur:** Am oberen Ende des Pendels eines Metronoms ist ein U-förmig gebogenes Glasröhrchen befestigt; ein Schenkel

<sup>1)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. 1912. Nr. 28.

ist ein wenig trichterförmig erweitert. Im Innern des Röhrchens befindet sich eine kleine frei bewegliche Schrotkugel. Das U-Röhrchen taucht in ein Wasserbad (von 37°).

Das U-Röhrchen wird vor dem Versuch sorgfältig gereinigt und an der Luft getrocknet. Der Blutstropfen, der mit der Franckeschen Nadel aus dem mit Benzin gereinigten Ohrläppchen oder der Fingerbeere entnommen wird, wird von dem trichterförmigen Teil mit einer kurzen, schleudernden Bewegung in den horizontalen Teil des U-Rohrs befördert. Hierauf läßt man durch den schmalen Schenkel des Rohres, das man vertikal hält, die Schrotkugel in Blut fallen, verschließt das eine Ende mit einem Stopfen und befestigt möglichst schnell das Röhrchen an dem Ende des Pendels. Das Uhrwerk wird eingeschaltet. Durch die Bewegung des Pendels wird die Kugel durch das Blut geschleudert. Der Moment, bei welchem die Bewegungen der Kugel aufhören, gibt den Beginn der Gerinnung an. Man stellt nun sofort das Uhrwerk durch eine besondere Arretiervorrichtung ab und notiert den Zeitpunkt der Gerinnung. Als Beginn des Versuchs ist der Zeitpunkt, in welchem das Blut aus der Stichwunde tritt, zu rechnen.

Methode nach Heubner und Rona<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die Gerinnungszeit wird an der Ausflußgeschwindigkeit des Blutes aus einer engen Glas-capillare gemessen.

Apparatur: Das Koagulometer besteht aus 4 gläsernen Teilen, von denen 2 durch Schliff, die übrigen durch Gummischlauch aneinandergefügt werden (vgl. Abb. 72).

A. Die Tropfpipette ist das wesentlichste Stück, sie dient zum Aufsaugen des flüssigen Blutes und zur Beobachtung des Abtropfens. Sie besteht aus einer Ampulle (1) von etwa 10 cm<sup>3</sup> Inhalt, einem abwärts davon angesetzten, ziemlich engen und langen Abtropfkanal (2) und einem oberhalb der Ampulle angesetzten Hahn (3).

B. Das Einsatzgefäß bildet eine kleine Flasche, in deren Hals das untere Ende der Tropfpipette eingeschliffen ist (4). Sie trägt außerdem ein senkrecht aufsteigendes Glasrohr (5), damit sie unter Wasser getaucht werden kann, ohne die Kommunikation mit der Luft zu verlieren. Das Gefäß dient ausschließlich zum Auffangen des abtropfenden Blutes.

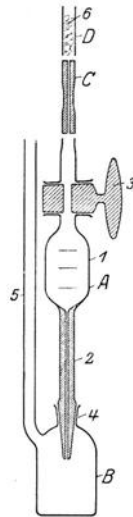


Abb. 72.

<sup>1)</sup> Heubner u. Rona: Biochem. Zeitschr. Bd. 130, S. 463. 1922.

C. Die Aufsatzcapillare ist ein kurzes, capillares Glasrohr mit einer sehr fein ausgezogenen Strecke, die dem Nachströmen von Luft in die Tropfpipette großen Widerstand bietet und dadurch das Abtropfen verlangsamt; sie wird durch ein Stück Gummischlauch mit der gefüllten Pipette verbunden.

D. Das Schutzröhrchen dient lediglich zur Verhütung des Einsaugens von Staub in die verengte Strecke der Aufsatzcapillare und dadurch bedingter Änderungen des Widerstandes; es wird lose mit Watte ausgestopft (6) und kann mit der Aufsaugcapillare dauernd durch ein Stück Gummischlauch verbunden bleiben.

Ausführung der Bestimmung: Aus einer Vene, die nur kurze Zeit gestaut sein darf, werden in der üblichen Weise durch eine Rekordspritze etwa 5 cm<sup>3</sup> Blut entnommen, dabei wird die Zeit des Beginns und Ende des Übertritts von Blut in die Spritze vermerkt; die Mitte zwischen beiden wird als Anfangspunkt für die Gerinnungszeit notiert. Aus der Spritze wird das Blut ohne Verzug in ein sauberes Porzellanschälchen entleert, daraus in die trockene und völlig saubere Tropfpipette aufgesogen, deren Hahn dann geschlossen wird. Spritze, Schälchen und Pipette sollen auf 37° vorgewärmt sein. Die gefüllte Tropfpipette wird bei geschlossenem Hahn in das Einsatzgefäß gesetzt, darauf in ein Wasserbad mit destilliertem Wasser getaucht; endlich wird auf die Pipette die Capillare nebst Schutzröhrchen gesetzt. Die Temperatur des Wasserbades soll konstant 37° betragen. Wenn der gefüllte und fertig zusammengestellte Apparat ruhig und senkrecht in dem Wasserbad steht, kann der Hahn geöffnet werden; man braucht sich damit nicht zu überhasten, der Zeitpunkt ist an sich gleichgültig und muß nur vor dem Eintritt der Gerinnung liegen. Erwartet man eine sehr langsame Gerinnung, so hält man den Hahn zweckmäßigerweise länger geschlossen oder schließt ihn vorübergehend wieder. Man beobachtet das Abtropfen des Blutes, das in regelmäßigen Intervallen von einigen Sekunden erfolgt. Werden die Intervalle länger, so verschärft man die Aufmerksamkeit, indem man den Fall jedes letzten Tropfens mit der bereitliegenden Uhr vergleicht; wenn eine Minute lang kein Tropfen mehr gefallen ist, so kann man abbrechen und den Augenblick des letzten Tropfenfalls als Endpunkt der Gerinnungszeit notieren. Die Ablesung kann mit Leichtigkeit auf 5 Sek. genau gemacht werden.

Die Reinigung des Apparates wird am besten nach Beendigung einer Bestimmung sofort vorgenommen, während das Koagulum noch weich und schlüpfrig ist. Man löst die Pipette vom Einsatzgefäß und der Aufsatzcapillare, zieht den Glashahn heraus,

verschließt die Öffnungen des Hahnlagers mit den Fingern und saugt am oberen Ende der Pipette; dadurch zieht sich gewöhnlich der in dem langen Abtropfkanal der Pipette befindliche Teil des Gerinnsels in die Ampulle zurück; häufig kann nun, besonders mit Hilfe eines kräftigen Wasserstrahls, das Gerinnsel in toto durch die Hahnöffnung ausgespült werden. Sonst wird es mit einem feinen Draht zerkleinert. Die Pipette kommt mehrere Stunden in Chromschwefelsäure, dann wird sie gründlich gewässert, mit Alkohol durchspült und mittels eines warmen Luftstromes getrocknet.

Methode von Frisch und Starlinger<sup>1)</sup>.

Verfasser benutzen Glasröhren von 20 cm Länge und 3 mm Lumen, die in Abständen von 3 mm kalibriert und an einem Ende etwas verjüngt sind. Sie sind zu zweit in einem Glasmantel montiert, aus dem nur die beiden Enden der Röhren hervorragen. Der Glasmantel wird mit Wasser von 20° gefüllt. Das Blut wird aus der Vene mit Hilfe paraffinierter Spritze entnommen, in ein paraffiniertes Glasschälchen entleert und von da in ein oder (zwecks Kontrolle) in beide Röhren aufgesaugt. Dann bleiben die Röhren in horizontaler Lage, werden nur jede Minute einmal soweit geneigt, daß ein Blutstropfen hervorquillt, der durch Filtrierpapier entfernt wird. Beim Zurücklegen wird der Apparat jedesmal um 180° um seine Längsachse gedreht, damit keine Sedimentierung der Blutkörperchen in den Röhren erfolgt. Bleibt bei der Prüfung am Filtrierpapier ein Fibrinfaden hängen, so wird dies als Beginn der Gerinnung, fließt kein Tropfen mehr aus, als Ende der Gerinnung notiert. Die Bestimmung erfordert für ein Röhren 1,5 cem Blut.

Methode von Wöhlisch<sup>2)</sup>.

Die die Gerinnung beeinflussenden Faktoren wie Temperatur, Berührung mit Fremdkörpern, Bewegung werden durch Verwendung eines besonderen Thermostaten und möglichst gleichmäßiges Bewegungen konstant gehalten.

Apparatur: Der Thermostat ist in der Abb. 73 im Längsschnitt gezeichnet. Er besteht aus einem auf 4 Füßen ruhenden Blechkasten mit doppelten Seitenwänden und doppeltem Boden. Der Außenmantel *M* des Apparates dient zur Aufnahme des Heizwassers, dessen Temperatur durch ein von oben hineinragendes

<sup>1)</sup> Wien. klin. Wochenschr. Bd. 34, S. 344. 1924.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 27, S. 61. 1922.



Thermometer  $Th_1$  kontrolliert wird. Durch eine unter den Thermostaten gestellte kleine Gasflamme kann die Wassertemperatur geregelt werden. Das herausnehmbare Dach  $D$  des Apparates ist zur Vermeidung von Wärmeverlusten ebenfalls doppelwandig und mit einer Öffnung in Form eines kurzen Rohrstützens versehen. Der Apparat hat 2 Doppelfenster, das eine  $F_1$  an der Vorderwand zur Beobachtung des Innenraumes, das zweite  $F_2$ , dem ersten

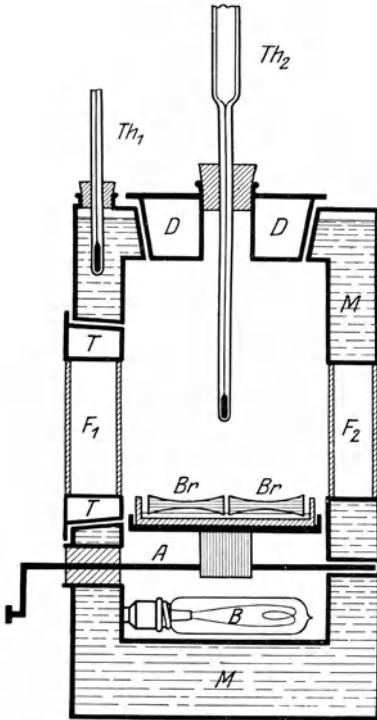


Abb. 73.

nau gegenüberliegend, an der Hin-  
rhwand zur Beleuchtung des Innen-  
raumes durch Tageslicht oder durch  
ne künstliche Lichtquelle. Die Fen-  
er sind als Doppelfenster ausgebildet.  
vecks besserer Wärmeisolierung.  
ährend das hintere Fenster fest ein-  
kittet ist, liegt das vordere Fenster  
einer doppelwandigen Blechtür  $T$ ,  
e den Zugang zum Innenraum des  
pparates gestattet. Sowohl die Tür  
s auch das Dach des Apparates er-  
uben mittels einer Gummidichtung  
nen luftdichten Verschluss. Das feste  
mpressen der Tür und des Daches  
ird durch drehbare Riegel besorgt.

Dicht über dem Boden des Appa-  
tes ist in horizontaler Lage eine  
hmale, zylindrisch geformte Glüh-  
röhre  $B$  angebracht, die als Wärme-  
quelle für das Innere dient, um die-  
s durch kurzes Einschalten des  
romes schnell auf die gewünschte  
emperatur bringen zu können. Dicht  
terhalb der Mitte der Tür führt  
ter luftdichtem Abschluss quer durch  
n Apparat von vorn nach hinten eine  
horizontale Metallachse  $A$ , deren  
vorderes Ende als Griff ausgebildet ist, mit dem man die Achse in ihren  
Lagern drehen kann. Die Achse trägt im Innern des Apparates  
abnehmbar aufmontiert eine Blechscheibe mit hochgebogenen  
Seitenrändern. Diese Scheibe dient als Unterlage für eine Petri-  
schale und diese wiederum zur Aufnahme der Brillengläser  $Br$   
für den Gerinnungsversuch. In Höhe der Petrischale wird die  
rechte Seitenwand von einem kurzen Rohr durchsetzt. Durch  
dieses hindurch folgt mittels einer längeren Kanüle das Ein-

spritzen des Blutes in die Gläser. Das Rohr ist für gewöhnlich durch einen Gummistopfen verschlossen.

Durch Drehen der Achse kann man ein seitliches Neigen der Gläser zum Zweck der Kontrolle des Gerinnungsvorganges bewerkstelligen. Die Fenster liegen mit ihrem unteren Rande gerade in Höhe der Petrischale, so daß man sehr flach über die Blutoberfläche hin gegen die Lichtquelle visieren kann. Durch die mit dem durchbohrten Korken versehene Öffnung des Deckels führt ein langes möglichst empfindliches Thermometer  $Th_2$ . Um Verdunsten des Blutes während der Gerinnung zu verhindern, wird durch eine mit Wasser getränkte Wattelage, auf der die Brillengläser stehen, die Luft mit Wasserdampf gesättigt. Die Brillengläser sind bikonkave Gläser von — 10,0 Dioptrien innerer Krümmung und ca. 4 cm Durchmesser.

Ausführung: Man stellt zwei, sorgfältig mit destilliertem Wasser, Alkohol und Äther gereinigte Brillengläser in Richtung der Achse hintereinander in die Petrischale, verschließt die Tür und bringt das Wasser im Mantel und die Luft im Beobachtungsraum auf die gewünschte Temperatur. Man wartet einige Zeit, damit die Gläser ebenfalls die richtige Temperatur annehmen können. Dann Venenpunktion mit trockener, sauberer Spritze und Einspritzen der gleichen Anzahl Tropfen (gleicher Neigungswinkel der Kanüle!) Blut durch die seitliche Öffnung in jedes der beiden Gläser (0,75 oder 1,0 cm<sup>3</sup>). Die Tropfen sollen auf die tiefste Stelle der Gläser fallen. Dann Verschließen des Eintropfrohrs. Notieren der Zeit. Jede Minute einmal sanftes Neigen des Schälchens nach beiden Seiten, wobei darauf zu achten ist, daß das Blut nicht durch Überfließen seine ursprüngliche kreisförmige Berührungsfläche mit dem Glase vergrößert. Der Zeitpunkt, in welchem bei Neigung des Schälchens nicht die geringste Bewegung der Oberfläche des Blutes mehr wahrzunehmen ist, wird als Ende der Gerinnung vermerkt.

Methode von Wöhlisch und Pieritz<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die Zeit wird bestimmt, die bis zum Auftreten einer flockigen Trübung im hämolysierten Blut verstreicht.

Ausführung: Die Methode erfordert keine besondere Apparatur. Man bedarf nur eines kleinen Wasserbades, eines kleinen in das Wasserbad passenden, metallenen Reagensglasständers, einiger Reagensgläser, einiger Glasstäbe, eines Thermometers und einer möglichst hellen Lampe.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 27, S. 82. 1922.

Die Reagensgläser sollen möglichst von gleicher Weite sein. Die Gläser werden mit gleichen Mengen destillierten Wassers gefüllt und kommen dann in das im Wasserbad befindliche Reagensglasgestell. Das Wasser des Bades soll mit der endgültigen Flüssigkeitsmenge in den Reagensgläsern das gleiche Niveau haben. Die Gläser bleiben einige Zeit im Bade, bis sie die gewünschte Temperatur angenommen haben.

Dann entnimmt man durch Punktion aus der Armvene Blut und gibt in jedes der Gläser durch Abzählen der Tropfen, wobei streng auf die gleiche Haltung der Nadel zu achten ist, die gleiche Menge Blut. Nach dem Einspritzen des Blutes nimmt man je zwei Gläser zusammen aus dem Wasserbad, hält sie zur Beobachtung gegen die Lichtquelle und vermischt durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen eines Stempels das Blut mit dem Wasser, bis eine gleichmäßig rote Lösung entstanden ist. Man stellt die Gläser ins Wasserbad zurück und notiert den Zeitpunkt des Versuchsbeginns. Jede Minute beobachtet man das Blut vor der Lichtquelle unter zweimaligem langsamen Auf- und Abbewegen des Rührers (Glasstäbe von ca. 15 cm Länge und 4 mm Dicke, deren unteres Ende stempelartig zu etwa 8 mm auseinander gepreßt ist). Das Rühren soll gleichmäßig oft in derselben Weise vorgenommen werden. Der Beginn der Gerinnung verrät sich durch das plötzliche Auftreten einer feinen Trübung. Der Eintritt der Gerinnung läßt sich bei Zusatz von Serum genau ebenso scharf bestimmen, wie bei dem Versuch ohne Serumzusatz.

Logarithmentafel (vgl. dazu S. 54).

	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6	7	8	9
1	000	021	041	061	079	097	114	130	146	161	176	204	230	255	279
2	301	312	322	332	342	352	362	371	380	389	398	415	431	447	462
3	477	484	491	498	505	512	519	525	531	538	544	556	568	580	591
4	602	607	613	618	623	628	633	638	643	648	653	663	672	681	690
5	699	703	708	712	716	720	724	728	732	737	740	748	756	763	771
6	778	782	785	789	792	796	799	803	806	810	813	820	826	833	839
7	845	848	851	854	857	860	863	866	869	872	875	881	886	892	898
8	903	906	908	911	914	916	919	922	924	927	929	935	940	944	949
9	954	957	959	961	964	966	968	971	973	975	978	982	987	991	996

## Sachverzeichnis.

- Abderhalden, Erepsin-Bestimmung und -Nachweis nach 168.**  
 —, Nachweis von Abwehrfermenten nach 280.  
 Ableitungs-Elektroden 72, 73.  
 Abwehrfermente (nach Abderhalden) 280ff.  
 — Nachweis (nach Abderhalden, nach Pregl und de Crinis, nach Hirsch) 280, 281.  
 Acetaldehyd-Bestimmung (nach Neuberg und Gottschalk) 191.  
 Acetondauerhefe-Darstellung (nach Buchner) 179.  
 Adenase-Bestimmung (nach Levene) 295.  
 — und Guanase 297.  
 Adsorption und Elution 3.  
 Adsorptionswert (A. W.) 4.  
 Äquivalentleitfähigkeit 42.  
 Aethylbutyrat-Spaltung durch Leberlipase 43.  
 Affinitätskonstanten bei Fermenten 52.  
 Aktivatoren und Paralytoren 88.  
 Aktivitäts- $p_h$ -Kurven 46.  
 —  $p_s$ -Kurven 47.  
 Aktivitätszahl von Invertin 134.  
 Alkoholische Gärung 178ff.  
 Allantoin-Darstellung (nach Wiechowski) 299.  
 Aluminiumhydroxyd (Präparate nach Willstätter) 141.  
 Amidasen 286ff.  
 Aminosäurestickstoff-Bestimmung (nach Folin) 276.  
 Amylase 140ff.  
 — -Bestimmung 168ff.  
 — -Bestimmung (nach Olsson) 169.  
 — -Einheit 175.  
 —, Leber- 143.  
 —, Leber-, Bestimmung (nach Holmbergh) 177.  
 —, Malz- 144.  
 —, Speichel- und Pankreas- 141.  
 Rona, Fermentmethoden.
- Amylase, Speichel-, Bestimmung (nach Pringsheim und Gorodiski) 177.  
 — -Trennung von Trypsin und Lipase 142.  
 Arabinose (Reduktionstabelle nach Bertrand) 151.  
 Arginase 288ff.  
 Arginin-Darstellung (nach Kossel und Groß) 289.  
 Autolyse 269ff.  
 — -Nachweis (nach Salkowski, nach Rona und Mislowitzer) 269, 270.  
 Autolysensaft 125.
- Bach, Tyrosinase-Bestimmung nach 304.**  
 Bang, Mikro-Kjeldahl-Stickstoffbestimmung nach 271.  
 Battelli und Stern, Leberkatalase nach 300.  
 — und Stern, Uricase-Untersuchung im Tiergewebe nach 299.  
 Bertrand, Glucose-Bestimmung nach 144.  
 —, Invertzucker-Reduktionstabelle nach 150.  
 Bestimmung, Acetaldehyd- (nach Neuberg und Gottschalk) 191.  
 —, Adenase- (nach Levene) 295.  
 —, Aminosäurestickstoff- (nach Folin) 276.  
 —, Amylase- 168ff.  
 —, Blausäure- (nach Brunswik) 166.  
 —, der Blutgerinnungszeit (nach Fuld, nach Heubner und Rona, nach Frisch und Starlinger, nach Wöhlisch, nach Wöhlisch und Pieritz) 314.  
 —, Emulsin- (nach Brunswik) 166.  
 —, Emulsin- (nach Willstätter und Csányi, nach Helferich) 163, 165.

- Bestimmung, Enterokinase- (nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz) 264.
- , Erepsin- (nach Cohnheim, nach Waldschmidt-Leitz, nach Abderhalden) 267, 268.
- der fettspaltenden Fermente 96ff.
- , Fibrinogen- (nach Starlinger) 310.
- der Gärung (nach Warburg-Dorner, nach Meyerhof) 187, (nach Willstätter und Steibelt) 185.
- , gasanalytische, für Lipase (nach Rona und Lasnitzki) 106.
- Glucose- (nach Bertrand) 144.
- Glucose (nach Hagedorn-Jensen, nach Willstätter und Schübel) 153.
- , Glycerophosphatase- (nach Neuberger und Karczag) 122.
- , Glykolyse 194ff.
- Glykolyse- im Blut (nach Rona und Wilenko) 211.
- , Glykolyse-, im lebenden Gewebe (nach Warburg) 198, 199.
- , Harnsäure- in Organen (His und Hagen) 298.
- , Histozyzm- (nach Smorodinzew) 288.
- , Katalase (nach Hennichs, Tsuchihashi Morgulis, Rona und Dambowiceanu) 301, 302.
- , Lab- (nach Michaelis-Rothstein, nach Rona und Gabbe) 231.
- , Lactase- (nach Willstätter und Oppenheimer) 168.
- , Leberamylase- (nach Holmbergh) 177.
- , Maltase- (nach Kasamoto) 162.
- , Malzamylase- (nach Euler und Svanberg) 176.
- , Milchsäure-, im Muskelgewebe (nach Fürth-Charnas, nach Ripper, Modifikation nach Hirsch-Kauffmann, Embden und Meyerhof) 194.
- , nephelometrische, für Amylasen (nach Rona und van Eweyk) 172.
- , nephelometrische der Trypsinwirkung (nach Rona und Kleinmann) 258.
- , Pankreasamylase- (nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse) 174.
- , Pepsin-, in Körpersäften 226.
- Bestimmung, Pepsin- im Magensaft 226.
- , Pepsin- (nach Mett, nach Grützner, nach Volhard und Löhlein, nach Fuld und Levi-sohn, nach Jacoby) 215, 216, 217, 219.
- , Pepsin- (nach Michaelis und Rothstein, nach Gläßner, nach Groß, nach Sörensen, nach Rona und Kleinmann) 220, 221, 222, 224.
- , Peroxydase- aus Meerrettich (nach Willstätter und Stoll) 306.
- , Phosphor- (nach Lieb) 116.
- , Phosphorsäure- (nach Embden) 120.
- , Ricinuslipase- (nach Willstätter-Waldschmidt-Leitz) 105.
- , Saccharase- 144.
- , Speichelamylase- (nach Pringsheim und Gorodiski) 177.
- , stalagmometrische, für Lipase (nach Rona und Michaelis) 96.
- , Stickstoff- (nach Folin) 273.
- , Stickstoff- (Mikro-Kjeldahlmethode nach Bang) 721.
- , Thrombin- (nach Wohlgenuth) 313.
- , titrimetrische, für Lipase (nach Willstätter, nach Knaffl-Lenz) 100.
- kleiner Traubenzuckermengen (nach Moeckel u. a.) 147.
- , Traubenzucker- (nach Michaelis) 148.
- , Traubenzucker-elektrometrische (nach Mislowitzer) 157.
- , Trypsin- (nach Palitzsch und Walbum, nach Northrop, nach Sörensen, nach van Slyke, nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz, nach Willstätter und Per-siel) 237, 238, 241, 246, 254, 255, 256.
- , Tyrosinase- (nach Bach, nach Raper und Wormall) 304.
- der Ureasewirkung (nach Lövgren) 286.
- der Wasserstoffionenkonzentration (mit Indicatoren, nach Sörensen, nach Michaelis) 58, 60.

- Bimolekulare Reaktion 43.  
 Birnen-Elektrode (nach Michaelis) 74.  
 Blausäure-Bestimmung (nach Brunswik) 166.  
 — und Glykolyse 204.  
 — und Papain 285.  
 Bleibtreu-Atzlersche Thrombindarstellungsmethode, vereinfacht von Tsunoo 312.  
 Blut, Glykolyse-Bestimmung im 198.  
 Blutgerinnungs-Fermente 309ff.  
 Blutgerinnungszeit-Bestimmung (nach Fuld, nach Heubner und Rona, nach Frisch und Starlinger, nach Wöhlisch, nach Wöhlisch und Pieritz) 314.  
 Blutkatalase-Darstellung (nach Tsuchihashi) 300.  
 Boysen-Jensen, Co-Fermentdarstellung nach 183.  
 —, Darstellung Co-zymasefreier Hefe nach 184.  
 Brunswik, Mikro-Bestimmung des Emulsins nach 166.  
 Buchner, Acetondauerhefe-Darstellung nach 179.  
 —, Hefepreßsaft-Darstellung nach 178.  
 Bürker, Colorimeter nach 35.  
  
**Carboxylase** 191ff.  
 Chinhydron-Elektrode 76.  
 Chloroform zur Fermentkonservierung 14.  
 Chromophotometer (nach Plesch) 36  
 Chymosin 228ff.  
 — -Darstellung (nach Hammarsten) 228.  
 Clark und Lubs, Puffermischung nach 57.  
 Co-Ferment 182ff.  
 Co-Fermentdarstellung (nach Boysen-Jensen) 183.  
 — -Fermentdarstellung aus Hefekochsaft 182.  
 Cohnheim, Erepsin-Bestimmung und -Nachweis nach 267.  
 —, Erepsin-Darstellung nach 265.  
 Colorimeter (nach Duboscq, nach Bürker) 34, 35.  
 Colorimetrie 34ff.
- Darmlipase-Darstellung** (nach Hamsik) 95.  
 Darmsaccharase 135.  
 Darstellung von Acetondauerhefe (nach Buchner) 179.  
 — von Allantoin (nach Wiechowski) 299.  
 — von Arginase (nach Edlbacher und Bonen) 289.  
 — von Arginin (nach Kossel und Groß) 289.  
 — von Blutkatalase (nach Tsuchihashi) 300.  
 — von Chymosin (nach Hammarsten) 228.  
 — von Co-Ferment (nach Boysen-Jensen) 183.  
 — von Co-Ferment aus Hefesaft 182.  
 — von Co-zymasefreier Hefe (nach Boysen-Jensen) 184.  
 — von Darmlipase- (nach Hamsik) 95.  
 — von Emulsin (nach Willstätter und Csányil) 137.  
 — von Emulsin aus Pflaumenkernen (nach Helferich) 138.  
 — von Enterokinase (nach Waldschmidt-Leitz) 262.  
 — von Erepsin (nach Cohnheim, nach Raubitschek, nach Waldschmidt-Leitz) 265, 266.  
 — von Hefepreßsaft (nach Buchner) 178.  
 — von Hefesaft und Trockenhefe- (nach von Lebedew) 180.  
 — hexosephosphorsaurer Salze 188.  
 — von Histozyim (nach Smorodinzew) 288.  
 — von Lab (nach Wohlgemuth) 228.  
 — von Lactase (nach Willstätter) 139.  
 — von Lactase (nach E. Fischer) 139.  
 — von Leberkatalase (nach Battelli und Stern, nach Hennichs) 300.  
 — von Lipasen:  
   Pankreaslipase 89.  
   Leberlipase 93.  
   Magenlipase 94.  
   Serumlipase 95.  
   Ricinuslipase 96.  
 — von Maltase (nach Willstätter, Oppenheimer und Steibelt) 135.

- Darstellung von Nucleosidase (nach Levene) 294.
- von Pankreasamylase (nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse) 141.
- von Papain (nach Willstätter) 283.
- von Pepsin (nach Pekelharing, nach Hammarsten) 212, 213.
- von Peroxydase aus Meerrettich (nach Willstätter und Stoll) 306.
- von Saccharase aus Hefe (nach Hudson, nach Euler und Josephson, nach Willstätter und Mitarbeitern) 123, 124, 125, 126.
- von Speichelamylase (nach Pringsheim und Gorodiski) 141.
- von Thrombin, vereinfachte Bleibtrenn-Atzlersche Methode von Tsunoo 312.
- von Thrombokinase (nach Morawitz) 313.
- von Trypsin (nach Michaelis, nach Willstätter, Waldschmidt und Leitz) 234.
- von Urease (nach Jakoby und Sugga) 286.
- urikolytischer Fermentlösungen (nach Schittenhelm) 298.
- Desamidierende Fermente (Adenase, Guanase) 297.
- Dialyse und Filtration 4.
- Dialysier-Verfahren von Abwehrfermenten 280.
- Diastase 140ff.
- Drehung, spezifische, aktiver Substanzen 20.
- Duboscq, Colorimeter nach 34.
- E**dlbacher und Bonen, Arginase-Darstellung nach 289.
- Ege, Modifikation der Bestimmungsmethode von Fuld und Levison 218.
- Eichung der Gefäße zur gasanalytischen Bestimmung 107.
- Einheit, Amylase- 175.
- , Arginase- 291.
- , Lipase- 102, 100.
- , Enterokinase-264.
- für die Gärwirkung 191.
- , Saccharase- 134.
- , Trypsin-25.
- Eintauchfilter (nach Giemsa) 10.
- Eisenhydroxyd, kolloidales, Enteiweißung mittels 275.
- Eiweißspaltende Fermente 212ff.
- Elektrode, Ableitungs- und Bezugs- 72.
- , Chinhydron- 76.
- , Kalomel-, Herstellung 72, 73.
- Elektrodialyse (nach W. Pauli, nach Freundlich und L. Farmer-Loeb) 12, 13.
- Elution und Adsorption 3.
- Embden, Milchsäure-Bestimmung im Muskelgewebe nach 194.
- , Phosphorsäure-Bestimmung nach 120.
- Emulsin 137.
- -Bestimmung (nach Willstätter und Csányi, nach Helferich, nach Brunswik) 163, 165, 166.
- -Darstellung (nach Willstätter und Csányi) 137.
- Darstellung aus -Pflaumenkernen (nach Helferich) 138.
- , Zeitwert 139.
- Enteiweißung (nach Schenck, nach Rona und Michaelis) 274, 275, 276.
- Enterokinase 261ff.
- -Bestimmung (nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz) 264.
- , Fermenteinheit für 264.
- -Trennung von Trypsin 262.
- Enzym siehe Ferment.
- Erepsin 265ff.
- -Bestimmung und -Nachweis (nach Cohnheim, nach Waldschmidt-Leitz, nach Abderhalden) 267, 268.
- , Glycylglycin-Spaltung durch 44.
- -Trennung vom Trypsin (nach Waldschmidt-Leitz) 266.
- Esterasen 89ff., 114ff.
- Euler und Josephson, Saccharase-Darstellung aus Hefe 125.
- und Svanberg, Malzamylyase-Bestimmung nach 176.
- Extraktions-Mittel von Fermenten 2.
- F**aust-Heimscher Trockenapparat 2.
- Fermente-Affinitätskonstanten 52.
- Fermenteinheit vgl. Einheit.
- Fermentmaße und Fermenteinheiten 51.

- Fibrinogen-Bestimmung (nach Starlinger) 310.
- Fibrinogenlösungen-Gewinnung (nach Hammarsten und Nolf) 309.
- Filter, Eintauch- (nach Giemsa) 10.
- -Geräte und -Vorrichtungen (nach Bechhold-König; der Firma Schott) 12.
- Filterröhrchen (nach Pregl) 118.
- Filtration und Dialyse 4.
- Fischer, E., Lactase-Darstellung nach 139.
- Folin, Aminosäurestickstoffbestimmung nach 276.
- , Stickstoff-Bestimmung nach 273.
- Formoltitration nach Sörensen 241.
- Freundlich und L. Farmer Loeb, Elektrolyse nach 13.
- Frisch und Starlinger, Blutgerinnungszeit-Bestimmung nach 317.
- Fruchtzucker, spezifische Drehung von 22.
- Fürth-Charnas, Milchsäure-Bestimmung im Muskelgewebe nach 194.
- Fuld, Blutgerinnungszeit-Bestimmung nach 314.
- und Levison, Pepsin-Bestimmungsmethode nach 217.
- , Reihenanzordnung nach 15.
- G**ärschema (Neuberg) 178.
- Gärung, alkoholische 178 ff.
- , Bestimmung (nach Willstätter und Steibelt) 185.
- Gärung, Bestimmung (nach Warburg-Dorner, nach Meyerhof) 187.
- Galaktose, (Reduktionstabelle nach Bertrand) 151.
- d-Galaktose, spezifische Drehung von 22.
- Gasanalytische Bestimmung für Lipase (nach Rona und Lasnizki) 106.
- Gaskette, Wasserstoffionenkonzentrationsmessung (nach Michaelis) 62 ff.
- Gelatinelösung, Herstellung nach Loeb 238.
- Gewebe, glykolysierendes, Serumwirkung auf 205.
- , lebendes, Glykolyse-Bestimmung im (nach Warburg) 198, 199.
- Gewebsproteasen 269 ff.
- Giemsa, Eintauchfilter nach 10.
- Gläbner, Pepsin-Bestimmung nach 221.
- Glucose siehe Glykose
- Glycerin, Fermentlöslichkeit in 3.
- Glycerophosphatase 121.
- -Bestimmung (nach Neuberg und Karczag) 122.
- Glycylglycin-Spaltung durch Erepsin 44.
- Glykolyse 194 ff.
- unter anaeroben und aeroben Bedingungen 200, 201.
- -Bestimmung 194 ff.
- -Bestimmung im Blut (nach Rona und Wilenko) 211.
- -Bestimmung im lebenden Gewebe (nach Warburg) 198, 199.
- und Blausäure 204.
- Glykose-Bestimmung (nach Bertrand) 144.
- neben Maltose, Bestimmungsmethode 171.
- Groß, Pepsin-Bestimmung nach 222.
- Grützner, Pepsin-Bestimmung nach 215.
- Guanase und Adenase 297.
- Günzburgsche Reaktion 226.
- h* = Wasserstoffzahl 53.
- H**agedorn-Jensen, Traubenzucker-Bestimmungsmethode 153.
- Halbschatten-Polarisationsapparat 17.
- Hammarsten, Chymosin-Darstellung nach 228.
- und Nolf, Fibrinogenlösungen, Gewinnung nach 309.
- , Pepsin-Darstellung nach 213.
- Hamsik, Darmlipase-Darstellung nach 95.
- Harn, Pepsin-Nachweis im (nach Hedin) 227.
- Harnsäure-Bestimmung in Organen (nach His und Hagen) 298.
- -Nachweis in Gewebsauszügen (nach Steudel und Suzuki) 297.
- Hedin, Pepsinnachweis im Harn nach 227.
- Hefe, Acetondauer-, Darstellung (nach Buchner) 179.
- , Co-zymasefreie, Darstellung (nach Boysen-Jensen) 184.



- Hefeautolysate-Verarbeitung 127.  
 Hefepreßsaft-Darstellung (nach Buchner) 178.  
 Hefesaft, Co-Fermentdarstellung aus 182.  
 — und Trockenhefe-Darstellung (nach von Lebedew) 180.  
 Helferich, Emulsin-Bestimmung nach 165.  
 —, Emulsin-Darstellung aus Pflaumenkernen nach 138.  
 Hennichs, Katalase-Bestimmung nach 301.  
 —, Leberkatalase-Darstellung nach 300.  
 Heubner und Rona, Blutgerinnungszeit-Bestimmung nach 315.  
 Hexosephosphorsäure 122, 181, 188.  
 Hirsch, interferometrischer Nachweis von Abwehrfermenten nach 281.  
 Hirsch-Kauffmann, Milchsäure-Bestimmung im Muskelgewebe nach 194.  
 His und Hagen, Harnsäure-Bestimmung in Organen nach 298.  
 Histozym 287.  
 Holmbergh, Leberamylase-Bestimmung nach 177.  
 Hoppe-Seyler, Speichel-Gewinnung nach 141.  
 Howell, Thrombin-Gewinnung nach 312.  
 Hudson, Saccharase-Darstellung nach 124.
- Indikatoren** 59ff.  
 — -Methode zur Wasserstoffionenkonzentrationsbestimmung 58.  
 Interferometrie 28ff.  
 Interferometrischer Nachweis von Abwehrfermenten (nach Hirsch) 281.  
 Inversionsfähigkeit von Invertin 133, 134.  
 Invertin siehe auch Saccharase 123.  
 — -Konzentration, Maße für 132ff.  
 — und Wasserstoffionen 47.  
 Invertzucker (Reduktionstabelle nach Bertrand) 150.
- Jakoby**, Pepsin-Bestimmungsmethode nach 219.
- Jakobi und Sugga, Urease-Darstellung nach 286.  
 Jod-Methode bei Amylasen (nach Wohlgemuth, nach Michaelis) 170.  
 Josephson, Bestimmung des Emulsins nach 165.
- Kalomel-Elektrode**, Herstellung 72, 73.  
 Kaolin-Enteiweißung (nach Michaelis und Rona) 276.  
 —, salzsäurebehandeltes 141.  
 Katalase 300ff.  
 — -Bestimmungsmethoden (nach Hennichs, nach Tsuchihashi, nach Morgulis, nach Rona und Damboviceanu) 301, 302.  
 Kinetische Messungen 42.  
 Knaffl-Lenz, Bestimmungsmethode für Lipase nach 102.  
 Kohlehydratspaltende Fermente 123.  
 Kolloidium, Dialysiermembranen aus 4  
 — -Dialysierschlauch-Herstellung (nach Michaelis und nach Trendelenburg) 6.  
 Kompensationsschaltung (nach Poggendorf) 65.  
 Konduktometrie 38ff.  
 Konservierung von Fermenten 14.  
 Kossel und Groß, Arginin-Darstellung nach 289.  
 Kusumoto, Bestimmung der Maltase nach 162.
- Lab** 228ff.  
 — -Darstellung (nach Wohlgemuth) 228.  
 — -Nachweis (nach Michaelis und Rothstein, nach Rona und Gabe) 231, 232.
- Lactase 139ff.  
 — -Bestimmung (nach Willstätter und Oppenheimer) 168.  
 — -Darstellung (nach E. Fischer, nach Willstätter) 139.  
 — -Zeitwert 140.
- Lakkase 305.  
 Laktose, (Reduktionstabelle nach Bertrand) 152.  
 Lampe (nach Airila und Komppa) 17.  
 Lampen für den Polarisationsapparat 16.  
 Latapie, Organzerkleinerung mit 1.

- Lebedew, von, Trockenhefe und Hefesaft-Darstellung nach 180.  
 Leberamylase 143.  
 — -Bestimmung (nach Holmbergh) 177.  
 Leberkatalase-Darstellung (nach Battelli und Stern, nach Henrichs) 300.  
 Leberlipase-Darstellung (nach Willstätter und Memmen) 93.  
 Leitfähigkeit von Kaliumchloridlösungen 42.  
 —, molare 42.  
 —, spezifische 41.  
 Leitfähigkeitsmessung 38.  
 Levene, Nucleosidase-Darstellung nach 294.  
 Lieb, Phosphorbestimmung nach 116.  
 Lipase:  
   Pankreas- 89.  
   Leber- 93.  
   Magen- 94.  
   Serum- 95.  
   Ricinus- 96.  
 Lipase-Einheit 102.  
 — -Einheit für Tributyrinspaltung 100.  
 —, Leber-, Äthylbutyrat-Spaltung durch 43.  
 —, Ricinus-, Bestimmung (nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz) 105.  
 — -Trennung von Amylase und Trypsin 142.  
 Loeb, Gelatinelösung nach 238.  
  
**Mc Ilvaine**, Puffermischung nach 58.  
 Magenlipase-Darstellung (nach Willstätter und Memmen, nach Willstätter, Haurowitz und Memmen) 94.  
 Magensaft, Pepsin-Bestimmung im 226.  
 Maltase 135ff.  
 — -Bestimmung, polarimetrische (nach Willstätter, Oppenheimer und Steibelt) 162.  
 — -Darstellung (nach Willstätter, Oppenheimer und Steibelt) 135.  
 — -Trennung von Saccharase (nach Willstätter und Bamann) 136.  
 Maltose neben Glucose, Bestimmungsmethode 171.  
 Maltose, (Reduktionstabelle nach Bertrand) 152.  
 —, spezifische Drehung von 22.  
 Malzamylyase 144.  
 — -Bestimmung (nach Euler und Svanberg) 176.  
 Meerrettich, Peroxydasen aus 306.  
 Membran, Dialysier-, aus Kolloidium 4.  
 Mett, Pepsin-Bestimmungsmethode nach 215.  
 Meyerhof, Co-Zymase aus Muskelkochsaft nach 183.  
 —, Gärungs - Bestimmung nach 187.  
 —, Milchsäure-Bestimmung im Muskelgewebe nach 194.  
 Michaelis, Jodmethode bei Amylasen 170.  
 —, Puffermischung nach 54.  
 —, U-Elektrode nach 75.  
 — und Rothstein, Lab-Nachweis nach 231.  
 — und Rothstein, Pepsin-Bestimmung nach 220.  
 —, Trypsin-Darstellung nach 234.  
 Mikro-Kjeldahl-Stickstoffbestimmung nach Bang 271.  
 Mikro-Zuckerbestimmung 16.  
 Milchsäure-Bestimmung im Muskelgewebe (nach Fürth-Charnas, nach Ripper, Modifikation nach Hirsch-Kauffmann, Embden und Meyerhof) 194.  
 Milchzucker, spezifische Drehung von 22.  
 Mislowitzer, elektrometrische Zucker-Bestimmung nach 157.  
 —, Potentiometer nach 70.  
 Moeckel, kleine Traubenzuckermengen-Bestimmung nach 147.  
 Molare Leitfähigkeit 42.  
 Monomolekularer Reaktionsverlauf oder Reaktion erster Ordnung 42.  
 Morawitz, Thrombokinase-Darstellung nach 313.  
 Morgulis, Katalase-Bestimmung nach 301.  
 Muskelgewebe, Milchsäure-Bestimmung im (nach Fürth-Charnas, nach Ripper, Modifikation nach Hirsch-Kauffmann, Embden und Meyerhof) 194.

- Muskelkochsaft, Co-Zymase aus (nach Meyerhof) 183.  
Mutarotation von Traubenzucker 21.
- Nachweis von Abwehrfermenten (nach Abderhalden) 280.  
—, Autolyse- (nach Salkowski, nach Rona und Mislowitzer) 269, 270.  
—, Erepsin- (nach Cohnheim, nach Waldschmidt-Leitz, nach Abderhalden) 267, 268.  
—, Harnsäure-, in Gewebsauszügen (nach Steudel und Suzuki) 297.  
—, interferometrischer, von Abwehrfermenten (nach Hirsch) 281.  
— von Nuclease-Spaltung (nach Sachs) 292.  
—, refraktometrischer, von Abwehrfermenten (nach Pregl und de Crinis) 281.
- Natriumwolframat, Enteiweißung mittels 274.
- Nephelometer (nach Kleinmann) 31.  
Nephelometrie 30 ff.
- Nephelometrische Bestimmungsmethode für Amylase (nach Rona und van Eweyk) 172. Für Pepsin und Trypsin (nach Rona und Kleinmann) 224, 258.
- Neuberg und Karztag, Glycerophosphatase-Bestimmung nach 122.
- Nicolsches Prisma im Polarisationsapparat 18.
- Nonius am Polarisationsapparat 20.
- Northrop, Trypsin-Bestimmung nach 238.
- Nucleasen 292 ff.
- Nucleosidase-Darstellung (nach Levene) 294.
- Nucleoside in Organauszügen (nach Thannhauser und Ottenstein) 295.
- Olsson, Amylase-Bestimmung nach 169.
- Ostwald, Ultrafilter nach 9.
- Oxydasen 305.
- $p_n$  = Wasserstoffexponent 53.
- Palitzsch und Walbum, Trypsin-Bestimmung nach 237.
- Pankreasamylase-Bestimmung (nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse) 174.
- Pankreasamylase-Darstellung (nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse) 141.
- Pankreaslipase 89 ff.
- -Darstellung (nach Rosenheim, nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz) 90.
- Papain 283 ff.
- -Darstellung (nach Willstätter) 283.
- Paralysatoren und Aktivatoren 88.  
Pauli, Elektrodialyse nach 12.
- Pekelharing, Pepsin-Darstellung nach 212.
- Pepsin 212 ff.
- -Bestimmung in Körpersäften 226.  
— -Bestimmung im Magensaft 226.  
— -Bestimmungsmethoden (nach Mett, nach Grützner, nach Löhlein und Volhard, nach Fuld und Levison, nach Jacoby, nach Michaelis und Rothstein, nach Gläßner, nach Groß, nach Sörensen, nach Rona und Kleinmann) 215, 216, 217, 219, 220, 221, 222, 224.  
— -Darstellung (nach Pekelharing) 212.  
—, freies, 226.  
—, Gesamt- 227.  
— -Nachweis im Harn (nach Hedin) 227.  
—, Serumalbumin-Spaltung durch 45.
- Peroxydase aus Meerrettich 306 ff.
- Pflanzenfermente, proteolytische 282 ff.
- Phosphatase 114 ff.
- Phosphor-Bestimmung (nach Lieb) 116.
- Phosphorsäure-Bestimmung (nach Embden) 120.
- Physikalische Methoden 16 ff.
- Plasma-Gewinnung 309.
- Plesch, Chromophotometer nach 36.
- Polarimetrie 16.
- Polarimetrische Methode (nach Abderhalden und Koelker) 268.
- Polarisations-Rohr 16.  
— -Rohr zur Beobachtung bei bestimmten Temperaturen 16.

- Polarisationsapparat, Halbschatten-17.
- Potentiometer (nach Mislowitzer) 70.
- Pregl und de Crinis, Nachweis von Abwehrfermenten nach 281.
- Pringsheim und Gorodiski, Speichelamylase-Bestimmung nach 177.
- und Gorodiski, Speichelamylase-Darstellung nach 141.
- Prisma, Hilfs-, im Refraktometer 27.
- Proteolytische Fermente 212.
- Pflanzenfermente 282ff.
- Puffer-Mischungen (nach Sörensens, nach Michaelis, nach McIlvaine, nach Clark und Lubs) 54, 55, 57, 58.
- Pulfrich, Refraktometer nach 23.
- R**aper und Wormall, Tyrosinase-Bestimmung nach 304.
- Raubitschek, Erepsin-Darstellung nach 265.
- Reaktion, bimolekulare 43.
- nullter Ordnung 42.
- Refraktometer (nach Pulfrich) 23.
- Refraktometrie 22ff.
- Refraktometrischer Nachweis von Abwehrfermenten (nach Pregl und de Crinis) 281.
- Regulatoren bei Wasserstoffionenkonzentration 53, 54.
- Reihenprinzip 15.
- Ricinuslipase-Bestimmung (nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz) 105.
- -Darstellung (nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz) 96.
- Ripper, Milchsäure-Bestimmung im Muskelgewebe nach 194.
- Rohrzucker-Spaltung durch Invertin 44.
- , spezifische Drehung von 21.
- Rona und Ammon, Bestimmung der lipolytischen Wirkung nach 103.
- und van Eweyk, nephelometrische Methode nach 172.
- und Gabbe, Lab-Nachweis nach 232.
- und Kleinmann, nephelometrische Trypsinwirkung nach 258.
- und Kleinmann, Pepsin-Bestimmung nach 224.
- und Lasnitzki, gasanalytische Lipase-Bestimmung nach 106.
- Rona und Michaelis, Enteiweißung mittels koll. Eisenhydroxyd 275, mittels Kaolin 276.
- und Michaelis stalagmometrische Lipase-Bestimmungsmethode nach 96.
- und Mislowitzer, Autolyse-Nachweis nach 270.
- und Wilenko, Glykolyse-Bestimmung im Blut nach 211.
- Rosenheim, Pankreaslipase-Darstellung nach 90.
- S**accharase (siehe auch Invertin) 123.
- -Bestimmung 144.
- , Darm- 135.
- -Darstellung aus Hefe (nach Hudson, nach Euler und Josephson, nach Willstätter und Mitarbeitern) 123, 124, 125, 126.
- -Einheit 134.
- -Trennung von Maltase (nach Willstätter und Bamann) 136.
- Saccharasewert 133.
- Saccharophosphatase 122.
- Sachs, Nuclease-Nachweis nach 293.
- Salicylase 305.
- Salkowski, Autolyse-Nachweis nach 269.
- Schenck, Enteiweißung nach 274.
- Schmidt, Thrombin-Gewinnung nach 311.
- Serum und glykolysierendes Gewebe 205.
- Serumalbumin-Spaltung durch Pepsin 45.
- Serumlipase-Darstellung 95.
- Slyke, van, Trypsin-Bestimmung nach 246.
- Smorodinzew, Histozyndarstellung und -Bestimmung nach 288.
- Sörensens, Pepsin-Bestimmung nach 222.
- , Puffermischungen nach 55.
- , Trypsin-Bestimmung nach 241.
- Sorbose Reduktionstabelle (nach Bertrand) 151.
- Speichel-Gewinnung (nach Hoppe-Seyler) 141.
- Speichelamylase-Bestimmung (nach Pringsheim und Gorodiski) 177.
- -Darstellung (nach Pringsheim und Gorodiski) 141.

- Spezifische Drehung aktiver Substanzen 20.  
 — Leitfähigkeit 41.  
 Stalagmometrische Lipase-Bestimmungsmethode (Rona und Michaelis) 96.  
 — Methode (nach Rona und Michaelis), Modifikation (nach Willstätter und Memmen) 100.  
 Starlinger, Fibrinogen-Bestimmung nach 310.  
 Steudel u. Suzuki, Harnsäure-Nachweis in Gewebsauszügen nach 297.  
 Stickstoff, Aminosäuren-Bestimmung (nach Folin) 276.  
 — -Bestimmung (nach Folin) 273.  
 — -Bestimmung (Mikro-Kjeldahlmethode nach Bang) 271.  
 — -Bestimmung (Tabellen) 250, 251.  
 Stromschlüssel nach E. Müller 78.  
 Sulfatase 122.
- Temperatur und Fermente** 52.  
 — und Umsatz 46.  
 Temperaturkoeffizient 46.  
 Temperaturkonstanten 46.  
 Thannhauser und Ottenstein, Nucleoside in Organauszügen nach 295.  
 Thermostaten, Temperatur-Konstanthaltung in 53.  
 Thrombin-Bestimmung (nach Wohlgemuth) 313.  
 — -Darstellung, vereinfachte Bleibtreu-Atzlersche Methode von Tsunoo 312.  
 — -Gewinnung (nach Schmidt, nach Howell, nach Tsunoo) 311, 312.  
 Thrombokinase-Darstellung (nach Morawitz) 313.  
 \*Thymol zur Fermentkonservierung 14.  
 Toluol zur Fermentkonservierung 14.  
 Tonerde-Adsorption der Saccharase 129.  
 — -Präparate 141.  
 Traubenzucker s. a. Glykose.  
 — -Bestimmung (nach Michaelis, nach Bertrand, nach Hagedorn-Jensen, nach Willstätter, nach Moeckel u. Frank) 148, 153, 155.
- Traubenzucker-Bestimmung, elektrometrische, (nach Mislowitzer) 157.  
 —, spezifische Drehung von 21.  
 Trennung, Lipase-, von Amylase und von Trypsin 142.  
 —, Maltase-, von Saccharase 136.  
 Trichloressigsäure, Enteiweißung mittels 274.  
 Trypsin 233 ff.  
 —, Amylase- und Lipase-Trennung 142.  
 — -Bestimmungsmethoden (nach Palitzsch und Walbum, nach Northrop, nach Sörensen, nach van Slyke, nach Willstätter, nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz, nach Willstätter und Persiel, nach Rona und Kleinmann) 237, 238, 241, 246, 254, 255, 256, 258.  
 — -Darstellungsmethoden (nach Michaelis, nach Willstätter, Waldschmidt und Leitz) 234.  
 — -Einheit 257.  
 — -Trennung von Enterokinase 262  
 — -Trennung von Erepsin (nach Waldschmidt-Leitz) 266.  
 — -Trennung von Lipase und Amylase 235.  
 Tsuchihashi, Blutkatalase-Darstellung nach 300.  
 —, Katalase-Bestimmung nach 301.  
 Tsunoo, vereinfachte Bleibtreu-Atzlersche Thrombin-Darstellungsmethode von 312.  
 Tyrode-Lösung 192.  
 Tyrosinase-Bestimmung (nach Bach, nach Raper und Wormall) 304.
- U**-Elektrode (nach Michaelis) 75.  
 Ultrafilter-Darstellung (nach W. Ostwald, nach Wha) 9, 10.  
 Unterhefe-Vorbehandlung 127.  
 Urease 286 ff.  
 Urikase im Tiergewebe (nach Battelli und Stern) 299.  
 Urikolytische Fermentlösungen, Darstellung 298.
- Vergleichszeitwert für Invertin 133.  
 Volhard und Löhlein, Pepsin-Bestimmungsmethode nach 216.

- Waldschmidt-Leitz**, Enterokinase-Darstellung nach 262.  
 —, Erepsinbestimmung und -Nachweis nach 267.  
 —, Trypsin-Trennung von Erepsin nach 266.  
**Warburg-Dorner**, Gärungsbestimmung nach 187.  
 — Glykolyse-Bestimmung im lebenden Gewebe nach 198, 199.  
**Wasserbad**, Temperatur-Konstanthaltung im 53.  
**Wasserstoffexponent** 53.  
**Wasserstoffionen-Aktivitätskurve** 46, 47.  
**Wasserstoffionenkonzentration** 46, 53 ff.  
 — und Invertin 47.  
 — -Messung mittels Gasketten (nach Michaelis) 62 ff.  
 —, optimale 79.  
**Wasserstoffzahl-Symbol** 53.  
**Wha**, Ultrafilter nach 10.  
**Widerstandskapazität** 41.  
**Wiechowski**, Allantoin-Darstellung nach 299.  
**Willstätter**, Lactase-Darstellung nach 139.  
 —, Papain-Darstellung nach 283.  
 —, Trypsin-Bestimmung nach 254.  
 — und Bamann, Saccharase-Trennung von Maltase nach 136.  
 — und Csányi, Emulsin-Bestimmung nach 163.  
 — und Csányi, Emulsin-Darstellung nach 137.  
 —, Haurowitz und Memmen, Magenlipase-Darstellung nach 94.  
 — und Memmen, Leberlipase-Darstellung nach 93.  
 — und Memmen, Magenlipase-Darstellung nach 94.  
 — und Memmen, Modifikation der stalagmometrischen Bestimmungsmethode (nach Rona und Michaelis) 100.  
 — und Mitarbeiter, Saccharase-Darstellung aus Hefe 126.  
 — und Oppenheimer, Lactase-Bestimmung nach 168.  
**Willstätter**, Oppenheimer und Steibelt, Bestimmung der Maltase 162, Darstellung der Maltase 135.  
 — und Persiel, Bestimmung des Trypsins 256.  
 — und Schübel, Traubenzucker-Bestimmungsmethode 155.  
 — und Steibelt, Gärungs-Bestimmung nach 185.  
 — und Stoll, Darstellung und Bestimmung von Peroxydasen aus Meerrettich nach 306, 307.  
 — und Waldschmidt-Leitz, Pankreaslipase - Darstellung nach 90.  
 — und Waldschmidt-Leitz, Ricinuslipase-Bestimmung nach 105.  
 — und Waldschmidt-Leitz, Ricinuslipase-Darstellung nach 96.  
 — und Waldschmidt-Leitz, Trypsin-Bestimmung nach 255.  
 — und Waldschmidt-Leitz, Trypsin-Darstellung nach 234.  
 —, Waldschmidt-Leitz und Hesse, Pankreasamylase-Bestimmung nach 174.  
 —, Waldschmidt-Leitz und Hesse, -Pankreasamylase-Darstellung nach 141.  
**Wöhlisch**, Blutgerinnungszeit-Bestimmung nach 317.  
 — und Pieritz, Blutgerinnungszeit-Bestimmung nach 319.  
**Wohlgemuth**, Jodmethode bei Amylasen nach 170.  
**Wohlgemuth**, Lab-Darstellung nach 228.  
 —, Thrombin-Bestimmung nach 313.  
**Xylose**, (Reduktionstabelle nach Bertrand) 151.  
**Zeitwert-Bestimmung:**  
   für Invertin 132.  
   für Emulsin 139.  
   für Lactase 140.  
**Zymophosphat** (Euler und Fodor) 188.