

**PRAKTIKUM  
DER PHYSIOLOGISCHEN  
CHEMIE**

VON

**PETER RONA.**

**ERSTER TEIL  
FERMENTMETHODEN**

**ZWEITE AUFLAGE**

**MIT 107 ABBILDUNGEN**



**BERLIN**  
**VERLAG VON JULIUS SPRINGER**  
1931

ISBN-13: 978-3-642-98291-0      e-ISBN-13: 978-3-642-99102-8  
DOI: 10.1007/978-3-642-99102-8

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

COPYRIGHT 1931 BY JULIUS SPRINGER IN BERLIN.  
SOFTCOVER REPRINT OF THE HARDCOVER 2ND EDITION 1931

MEINEM LIEBEN FREUNDE

LEONOR MICHAELIS

GEWIDMET

## Vorwort zur ersten Auflage.

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 vollzählige 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.

## Vorwort zur zweiten Auflage.

Seit dem Erscheinen dieses Werkes ist in der Fermentmethodik so eifrig gearbeitet worden, daß fast jeder Abschnitt der früheren Auflage mehr oder weniger wesentliche Änderungen und Ergänzungen erfahren mußte. Vollständigkeit wurde auch diesmal nicht erstrebt. Der ganze Text wurde gründlich revidiert.

Für wertvolle Hilfe bin ich Frau Dr. Neuenschwander-Lemmer und besonders den Herren Dr. R. Ammon und Dr. H. Fischgold aufrichtigen Dank schuldig.

Berlin, Oktober 1931.

P. Rona.

# Inhaltsverzeichnis.

<b>Allgemeiner Teil.</b>		Seite
Allgemeines über Darstellung der Fermente . . . . .		1
Auswählende Adsorption und Elution . . . . .		3
Aluminiumhydroxyd als Adsorbens . . . . .		4
Dialyse und Filtration . . . . .		8
Dialysiermembranen . . . . .		9
Kollodiumdialysierschlauch nach L. Michaelis . . . . .		9
Kollodiumdialysierschlauch nach P. Trendelenburg . . . . .		10
Ultrafilter nach W. Ostwald . . . . .		13
Eintauchfilter nach Giemsa . . . . .		14
Elektrodialyse . . . . .		15
Nach W. Pauli . . . . .		15
Nach H. Freundlich und L. Farmer-Loeb . . . . .		16
Nach Baer . . . . .		17
Konservierung . . . . .		19
Nachweis und Messung der Fermentwirkungen . . . . .		20
Das Reihenprinzip . . . . .		20
Chemische Methoden . . . . .		21
Physikalische Methoden. . . . .		22
Polarimetrie . . . . .		22
Refraktometrie . . . . .		28
Interferometrie . . . . .		34
Nephelometrie . . . . .		37
Nephelometer nach H. Kleinmann . . . . .		37
Kolorimetrie . . . . .		40
Kolorimeter nach Duboscq . . . . .		41
Viskosimetrie . . . . .		42
Dilatometrie . . . . .		43
Konduktometrie . . . . .		45
Kinetische Messungen . . . . .		49
Beziehungen zwischen Umsatz und Zeit . . . . .		49
Beziehungen zwischen Umsatz und Temperatur. . . . .		53
Beziehungen zwischen Umsatz und Azidität . . . . .		53
Beziehungen zwischen Umsatz und Substratmenge . . . . .		54
Enzymmaße und Einheiten . . . . .		59
Beeinflussung von Fermentwirkungen durch Änderung der äußeren Bedingungen . . . . .		60
Temperatureinfluß . . . . .		60
Die Wasserstoffionenkonzentration . . . . .		61
Puffermischungen . . . . .		61

	Seite
Bestimmungen der $[H^+]$ mittels Indikatoren . . . . .	67
Nach P. S. Sørensen . . . . .	68
Nach L. Michaelis . . . . .	69
Bestimmung der $[H^+]$ elektrometrisch . . . . .	71
Nach L. Michaelis . . . . .	77
Mit dem Potentiometer nach E. Mislowitzer . . . . .	79
Die Elektroden . . . . .	84
Chinhydronelektrode . . . . .	90
Messung der H-Ionenkonzentration mit Röhren-Voltmeter . . . . .	94
Die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Fermente . . . . .	101
Aktivatoren und Paralysatoren . . . . .	108

### Spezieller Teil.

Fettpaltende Fermente (Esterasen, Lipasen) . . . . .	111
Darstellung der Pankreaslipase . . . . .	111
Darstellung der Leberesterase . . . . .	115
Darstellung der Magenlipase . . . . .	117
Darstellung der Serumlipase . . . . .	118
Darstellung der Rizinuslipase . . . . .	118
Bestimmungsmethoden für die Lipasen . . . . .	119
Stalagmometrische Methode nach Rona und Michaelis . . . . .	119
Modifikation der Methode nach Willstätter und Memmen . . . . .	123
Titrimetrische Methode nach Willstätter . . . . .	125
Titrimetrische Methode nach Knaffl-Lenz . . . . .	127
Titrimetrische Methode nach Rona und Ammon . . . . .	129
Titrimetrische Methode nach Willstätter und Waldschmidt- Leitz für Rizinuslipase . . . . .	131
Gasanalytische Methode nach Rona und Lasnitzki . . . . .	132
Fermentative Esterifizierung . . . . .	143
Andere Esterasen . . . . .	144
Phosphatasen . . . . .	144
Bestimmung des Phosphors nach H. Lieb . . . . .	146
Bestimmung des Phosphors nach G. Embden . . . . .	150
Glyzerophosphatase . . . . .	152
Saccharophosphatase . . . . .	153
Sulfatase . . . . .	153
Kohlehydratpaltende Fermente . . . . .	155
Saccharase (Invertin) . . . . .	155
Darstellung nach Hudson und Willstätter und Racke . . . . .	157
Darstellung nach Euler und Josephson . . . . .	158
Darstellung nach Willstätter und Mitarbeiter . . . . .	159
Maße der Invertin-Konzentration . . . . .	166
Maltase . . . . .	169
Darstellung nach Willstätter und Mitarbeitern . . . . .	169
Trennung von Maltase und Saccharase nach Willstätter und Bamann . . . . .	171
Emulsin . . . . .	172
Darstellung nach Willstätter und Csányi . . . . .	172
Darstellung nach Helferich . . . . .	173
Fermentative Synthese von Glukosiden . . . . .	174

	Seite
Laktase . . . . .	175
Darstellung nach Willstätter und Oppenheimer . . . . .	175
Diastasen (Amylasen) . . . . .	176
Speichelamylase . . . . .	176
Pankreasamylase . . . . .	177
Darstellung nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse . . . . .	177
Trennung von Lipase und Trypsin . . . . .	177
Leberamylase . . . . .	179
Pflanzliche Amylasen . . . . .	179
Bestimmungsmethoden der kohlehydratspaltenden Fermente . . . . .	180
Bestimmung der Saccharase . . . . .	180
Glukosebestimmung nach Bertrand . . . . .	180
Glukosebestimmung nach Moeckel und Frank . . . . .	183
Glukosebestimmung nach L. Michaelis . . . . .	184
Tabellen für die Bertrand-Methode . . . . .	186
Glukosebestimmung nach Hagedorn-Jensen . . . . .	189
Glukosebestimmung nach Willstätter und Schudel . . . . .	191
Glukosebestimmung, polarimetrisch . . . . .	192
Bestimmung der Maltase . . . . .	193
Bestimmung des Emulsins . . . . .	194
Nach Willstätter und Csányi . . . . .	194
Nach Helferich . . . . .	196
Nach Josephson . . . . .	197
Nach Brunswik . . . . .	197
Bestimmung der Laktase . . . . .	199
Bestimmung der Amylase . . . . .	200
Nach Olsson . . . . .	200
Nach Wohlgemuth . . . . .	201
Nach Michaelis . . . . .	202
Nach Rona und van Eweyk . . . . .	203
Nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse . . . . .	206
Nach von Euler und Svanberg . . . . .	208
Nach Pringsheim und Gorodiski . . . . .	209
Nach Holmbergh . . . . .	209
Fermente der alkoholischen Gärung . . . . .	210
Darstellung von Hefepreßsaft nach Buchner . . . . .	210
Darstellung von Azetondauerhefe nach Buchner . . . . .	211
Darstellung von Trockenhefe und Hefesaft nach Lebedew . . . . .	212
Das Co-Enzym (Co-Zymase) . . . . .	213
Co-Zymase aus Muskelkochsaft nach Meyerhof . . . . .	215
Co-zymasefreie Hefe . . . . .	215
Bestimmung der Gärwirkung . . . . .	217
Nach Willstätter und Steibelt . . . . .	217
Nach Harden, Thomson und Young . . . . .	219
Nach Euler und Josephson . . . . .	220
Nach Warburg-Dorner und Meyerhof . . . . .	220
Darstellung der hexosephosphorsauren Salze . . . . .	222
Karboxylase . . . . .	226
Bestimmung des Azetaldehyds . . . . .	227

	Seite
Glykolyse . . . . .	232
Bestimmung der Milchsäure im Gewebe nach Fürth-Charnas, Ripper (modifiziert nach Hirsch-Kauffmann, Embden, Meyerhof) . . . . .	232
Bestimmung der Milchsäure im Gewebe nach Warburg . . . . .	237
Bestimmung der Glykolyse im Blut nach Rona und Wilenko . . . . .	252
Eiweißspaltende Fermente . . . . .	253
Pepsin . . . . .	253
Darstellung nach Pekelharing . . . . .	253
Darstellung nach Hammarsten . . . . .	254
Bestimmung nach Mett . . . . .	258
Bestimmung nach Grützner . . . . .	258
Bestimmung nach Volhard und Löhlein . . . . .	258
Bestimmung nach Fuld und Levisohn . . . . .	259
Bestimmung nach Ege . . . . .	260
Bestimmung nach Jacoby . . . . .	261
Bestimmung nach Michaelis und Rothstein . . . . .	262
Bestimmung nach Groß . . . . .	263
Bestimmung nach Sörensen . . . . .	264
Bestimmung nach Rona und Kleinmann . . . . .	265
Bestimmung nach Holster . . . . .	267
Bestimmung nach Sörensen, Katschioni-Walther und Lin- derström-Lang . . . . .	268
Bestimmung nach Ege im Magensaft . . . . .	270
Bestimmung nach Hedin im Harn . . . . .	271
Lab, Chymosin . . . . .	272
Darstellung nach Wohlgemuth . . . . .	272
Darstellung nach Hammarsten . . . . .	273
Bestimmung nach Michaelis und Rothstein . . . . .	275
Bestimmung nach Rona und Gabbe . . . . .	277
Trypsin . . . . .	277
Darstellung nach Michaelis . . . . .	278
Darstellung nach Willstätter und Waldschmidt-Leite . . . . .	278
Bestimmung nach Groß, Fuld, Michaelis . . . . .	284
Bestimmung nach Palitzsch und Walbum . . . . .	285
Bestimmung nach Northrop . . . . .	286
Bestimmung nach Sörensen . . . . .	289
Bestimmung nach van Slyke . . . . .	294
Bestimmung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz . . . . .	307
Bestimmung nach Willstätter und Persiel . . . . .	308
Bestimmung nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Mitarbeiter . . . . .	311
Bestimmung nach Linderström-Lang . . . . .	312
Bestimmung nach Rona und Kleinmann . . . . .	314
Enterokinase . . . . .	317
Trennung von Trypsin und Enterokinase nach Waldschmidt- Leitz . . . . .	317
Darstellung nach Waldschmidt-Leitz . . . . .	318
Bestimmung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz . . . . .	322
Erepsin . . . . .	322
Darstellung nach Cohnheim . . . . .	323
Darstellung nach Raubitschek . . . . .	323



	Seite
Trennung von Trypsin und Erepsin nach Waldschmidt-Leitz	324
Bestimmung nach Cohnheim	325
Bestimmung nach Waldschmidt-Leitz	326
Bestimmung nach Abderhalden	328
Messung der Peptidspaltung nach Krebs und Donegan	329
Gewebsproteasen (Autolyse)	332
Nachweis nach Salkowski	332
Nachweis nach Rona und Mislowitzer	332
Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl	334
Mikroverfahren nach Bang	334
Verfahren nach Folin	336
Enteiweißungsmethoden	336
Mit Sublimat nach Schenck	336
Mit Trichloressigsäure	337
Mit Natriumwolframat nach Folin und Wu	337
Mit kolloidalem Eisenhydroxyd nach Rona und Michaelis	338
Mit Kaolin nach Michaelis und Rona	338
Bestimmung des Aminosäurestickstoffs nach Folin	339
Abwehrfermente von E. Abderhalden	342
Nachweis nach E. Abderhalden	342
Nachweis nach Pregl und de Crinis (refraktometrisch)	344
Nachweis nach P. Hirsch (interferometrisch)	344
Proteolytische Pflanzenfermente	345
Papain	345
Darstellung nach Willstätter, Graßmann und Waldschmidt-Leitz	346
Bestimmung nach Willstätter, Graßmann und Waldschmidt-Leitz	347
Amidasen	349
Urease	349
Darstellung nach Jacoby und Sugga	349
Bestimmung nach Lövgren	349
Histozym	351
Darstellung und Bestimmung von Smorodinzew	351
Arginase	352
Darstellung von Edlbacher	353
Bestimmung von Edlbacher, Edlbacher und Bonen	355
Nukleasen	356
Nachweis nach Sachs, Tschernoruzki, Pighini	357
Darstellung von Nukleosidase nach Levene	358
Darstellung von Nukleosidase nach Tannhauser und Ottenstein	360
Bestimmung der Nukleosidase nach Euler und Brunius	361
Bestimmung der Hepato-Nukleotidase nach Deutsch	363
Darstellung von Adenase und Guanase nach Schittenhelm	364
Nachweis von Harnsäure in Gewebsauszügen nach Steudel und Suzuki	365
Bestimmung der Harnsäure in Organen nach His und Hagen	365
Darstellung von urikolytischen Fermentlösungen nach Schittenhelm	366
Nach Battelli und Stern	366
Darstellung des Alantoin nach Wiechowski	367

	Seite
Katalase . . . . .	367
Darstellung von Blutkatalase nach Tsuchihashi . . . . .	367
Darstellung von Leberkatalase nach Battelli und Stern und Hennichs . . . . .	368
Bestimmung der Katalase nach Hennichs. . . . .	369
Bestimmung der Katalase nach Tsuchihashi . . . . .	370
Bestimmung der Katalase nach Morgulis . . . . .	371
Tyrosinase. . . . .	371
Bestimmung nach Bach . . . . .	372
Bestimmung nach Raper und Wormal . . . . .	373
Bestimmung nach Haehn und Stern. . . . .	374
Bestimmung nach Schmalfuß, Lindemann, Hasebrock . . . . .	375
Lakkase. . . . .	376
Salizylase . . . . .	377
Peroxydase aus Meerrettich. . . . .	378
Darstellung nach Willstätter und Stoll . . . . .	378
Bestimmung nach Willstätter und Stoll. . . . .	379
Bestimmung nach Willstätter und Weber. . . . .	380
Thunbergs Methylenblau-Methode . . . . .	381
Fermente der Blutgerinnung . . . . .	384
Gewinnung des Nativplasmas . . . . .	384
Gewinnung von Fibrinogenlösungen nach Hammarsten . . . . .	385
Bestimmung des Fibrinogens nach Starlinger . . . . .	386
Gewinnung des Thrombins . . . . .	387
Nach Schmidt . . . . .	387
Nach Howell . . . . .	387
Nach Bleibtreu-Atzler und Tsunoo . . . . .	388
Gewinnung von Thrombokinasen nach Morawitz . . . . .	389
Bestimmung des Thrombins nach Wohlgemuth . . . . .	389
Bestimmung der Gerinnungszeit . . . . .	390
Nach Fuld . . . . .	390
Nach Heubner und Rona. . . . .	391
Nach Frisch und Starlinger . . . . .	392
Nach Wöhlisch. . . . .	393
Nach Wöhlisch und Pieritz . . . . .	395
Nach Bürker. . . . .	396
Sachverzeichnis . . . . .	402

# 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 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 fermenthaltigen Präparaten 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 Antiseptikum versetzt (siehe unter Konservierung) und bei einer niedrigen Temperatur gehalten. Die Organe kleinerer Tiere werden, wenn möglich, nach den Regeln der Asepsis entnommen. Zur Entfernung des Blutes 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 L a t a p i e 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 Porzellschale und mit ebenso behandeltem Pistill zermahlen. Gleichzeitig erreicht man bei der tiefen Temperatur ein Sistieren aller fermentativen Prozesse (siehe auch Muskelglykolyse, S. 233).

Der mit Quarzsand zu einer kompakten Masse zerriebene Brei kann in einer Presse weiter ausgepreßt werden (vgl. Spez. Teil, S. 210, 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. 213).

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 indifferenter 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 angeben. Als solche kommen in Betracht Wasser, physiologische Kochsalzlösung oder eine wässrige Lösung von einer bestimmten Azidität, ferner Gly-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 33, S. 5. 1901.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 113, S. 226. 1921.

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

zerin. 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 wässerigen oder glyzerinhaltigen 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, Alkohol, Glycerin), die Anwesenheit von Elektrolyten, die Wasserstoffionenkonzentration usw.

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

Als Maß für die Adsorption dient nach R. Willstätter der Adsorptionswert (A. W.). Er 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.

#### Aluminiumhydroxyd als Adsorbens.

Aluminiumhydroxyd *A*<sup>1</sup>). Das Verfahren für Aluminiumhydroxyd *A* lehnt sich an das für *B* (vgl. S. 5) an. Dieses, das erste Poly-Hydroxyd, wird durch Erhitzen mit Ammoniak anhydriert unter voller Schonung seiner plastischen Form. 250 g  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$  in 750 cm<sup>3</sup> Wasser erwärmt man auf 55° und trägt die Lösung auf einmal unter stärkstem mechanischem Rühren in 2,5 l auf 55° erwärmtes Ammoniak von 15 Gew.-% ein. Die Temperatur steigt auf 58° und wird unter fortgesetztem Rühren eine halbe Stunde zwischen 55 und 60° gehalten. Die sehr voluminöse Fällung wird während des Digerierens etwas dünner, aber nicht eben flockig. Dann wird die Mischung, die man nicht von der Mutterlauge zu trennen braucht, in einen 5 l-Kolben mit eingeschliffenem Kühler umgefüllt und darin 48 Stunden in gelindem Sieden erhalten. Die Flüssigkeit bleibt dabei genügend ammoniakalisch, etwa 10proz. Danach wird die Suspension im Dekantier-

<sup>1</sup>) Vgl. Willstätter und Kraut. Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 149. 1923; Bd. 57, S. 58. 1924 und Bd. 57, S. 1082. 1924. — Vgl. zur Darstellung der Tonerdehydrate auch Grassmann: Neue Methoden und Ergebnisse der Enzymforschung. München: J. F. Bergmann 1928.

topf auf 12 l verdünnt und unter möglichst vollständigem Dekantieren häufig mit Wasser gewaschen. Am besten vor dem vierten Male wird der Niederschlag zur Zerlegung noch vorhandener Spuren basischen Sulfats mit  $\frac{1}{2}$  l 15proz. Ammoniak verrührt. Dann wäscht man so lange aus, bis das Wasser drei aufeinanderfolgende Male nicht mehr klar geworden ist. Während der letzten Waschungen wird der Niederschlag immer kompakter, so daß am Ende die Waschflüssigkeit von dem am Boden klebenden plastischen Gele vollständig abgegossen werden kann. Daran erkennt man, daß das Auswaschen genügt.

Darstellung von Aluminiumhydroxyd *B*<sup>1)</sup>. (Geeignet zur Adsorption von Invertase und Lipase).

Die siedende Lösung von 500 g  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 + 18 \text{H}_2\text{O}$  in  $1\frac{1}{2}$  l Wasser trägt man auf einmal und unter kräftigem mechanischen Rühren in 5 l 20proz. Ammoniak ein, die im Emailtopf auf  $50^\circ$  erwärmt sind. Die Temperatur geht auf  $70^\circ$ ; man fährt mit dem Rühren noch  $\frac{1}{2}$  Stunde fort und läßt die Temperatur auf  $60^\circ$  sinken. Man dekantiert, wäscht unter Dekantieren noch dreimal mit Wasser nach und ersetzt die obige Lauge durch 4 l 20proz. Ammoniak. Mit diesem erwärmt man wieder im Emailtopf unter lebhaftem Rühren eine  $\frac{1}{2}$  Stunde auf  $60^\circ$ . Nach dem Erkalten gießt man die Suspension in einen gläsernen Filtrierstutzen von 12 l Inhalt und wäscht sie unter möglichst vollständigem Dekantieren häufig mit Wasser, nämlich bis sie sich nicht mehr klar absetzt und dann noch zwei weitere Male. Die Sorte *B* ist eine schwach gelbliche, zähe, plastische Masse.

Je vorsichtiger die Fällung des  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  mit Alkalien geschieht, desto mehr nähert sich der Niederschlag in seiner Zusammensetzung und im Verhalten der Base  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .

Zur Darstellung des Präparates *C* geben Willstätter und Kraut<sup>2)</sup> folgende Vorschrift. Die heiße Lösung von 500 g  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 + 18 \text{H}_2\text{O}$  in 1 l Wasser trägt man auf einmal in 6,5 l Ammoniumsulfat-Ammoniakwasser von  $60^\circ$  ein. Dieses Reagens enthält 300 g Ammonsulfat und  $420 \text{ cm}^3$  20proz. Ammoniak, d. i. 77,5 g statt ber. 76,6 g Ammoniak. Dieser kleine Überschuß ist wirklich nötig, die Flüssigkeit muß schwach alkalisch bleiben. Während des Fällens und eine weitere Viertelstunde wird lebhaft gerührt, wobei man die Temperatur nicht unter  $60^\circ$  sinken läßt. Die Fällung ist anfangs ungemein voluminös und wird erst während des Rührens flockig. Man verdünnt auf 40 l und dekantiert,

<sup>1)</sup> Willstätter und Kraut: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 150. 1923.

<sup>2)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 1117. 1923.

wobei der Niederschlag sich zunächst rasch absetzt. Um noch vorhandenes oder während des Auswaschens aus Ammoniumsulfat zurückgebliebenes basisches Aluminiumsulfat vollends zu zerlegen, fügt man zum Waschwasser beim vierten Dekantieren einmal  $80 \text{ cm}^3$  20proz. Ammoniak hinzu. Nach häufigem Auswaschen (zwischen dem 12. und 20. Mal) wird die Waschflüssigkeit nicht mehr klar. Von da ab dekantiert man noch zweimal, wozu mindestens einige Tage erforderlich sind. Das Präparat *C* ist eine ganz schwach gelbstichige, flockige und etwas plastische Masse<sup>1)</sup>.

Wichtig für die Adsorptionen verschiedener Fermentpräparate sind die von Willstätter und Kraut beschriebenen Präparate  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  der *C*-Sorte, deren Darstellung hier wiedergegeben werden soll<sup>2)</sup>. Die  $\alpha$ -Verbindung verwandelt sich unter Wasser bei Zimmertemperatur oft in einigen Stunden oder an einem Tage in das Hydroxyd  $\beta$ , das sehr langsam, in etwa 3—4 Monaten in die dritte Modifikation  $\gamma$  übergeht.

Darstellung der  $\alpha$ -Modifikation. Zur Fällung wird Ammoniakalaun dem einfachen Sulfat vorgezogen. Zur Verminderung der  $\text{OH}'$ -Konzentration wird zum Fällungsreagens Ammoniumsulfat zugefügt, und zwar 1 Mol  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  auf 1 Mol  $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2$ . Das Ammoniak (3,33 Mol) wird in jedem Versuch abgemessen und titrimetrisch bestimmt, um darauf die Menge des Alauns genau einzustellen. — 100  $\text{cm}^3$  10proz. Ammoniak werden in 600  $\text{cm}^3$  Wasser von  $63^\circ$ , das 22 g Ammoniumsulfat enthält, eingegossen und rasch auf  $58^\circ$  gebracht. Dazu gibt man unter starkem Rühren mit der Turbine auf einmal 150  $\text{cm}^3$  einer  $58^\circ$  warmen Lösung von 76,7 g Ammoniakalaun, wobei die Temperatur auf  $61^\circ$  steigt. Man läßt sie nicht unter  $58^\circ$  sinken und trennt 10 Minuten nach Beginn der Fällung in einer schnell auslaufenden Zentrifuge den Niederschlag möglichst rasch von der Mutterlauge ab. Er wird 5 mal auf der Zentrifuge nachgewaschen, wobei man das Gel in eine Flasche überspült und mit je 1,5 l Wasser durchschüttelt. Zum ersten Waschwasser fügt man 1,25 g  $\text{NH}_3$  hinzu, zum zweiten doppelt so viel. Beim 6. Zentrifugieren bleibt die überstehende Flüssigkeit trüb, der Niederschlag enthält dann nur noch Spuren von Sulfat. Jede Nachbehandlung mit Ammoniak dauert etwa 17 Minuten, die ganze Operation vom Beginn der Fällung bis zum Ende des Waschens  $2\frac{1}{4}$  Stunden.

Die Umwandlung der  $\alpha$ -Verbindung in  $\beta$  tritt in einigen Stunden nach der Ausfällung ein. Das Aussehen des Hydrogels ändert

<sup>1)</sup> Vgl. auch Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 57, S. 1088. 1924.

<sup>2)</sup> Willstätter, Kraut und Erbacher: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 58, S. 2448. 1925.



sich dabei: aus einer flockigen Suspension wird eine einzige kompakte Masse von gelbstichigem plastischem Gel. Unter Wasser verwandelt sich das  $\beta$ -Aluminiumhydroxyd allmählich (10 Tage bis mehrere Monate) in die  $\gamma$ -Modifikation, wobei die plastischen Eigenschaften des Gels abnehmen; das Präparat bildet eine schöne, flockige Suspension. Das  $\gamma$ -Hydrogel hat außer den basischen auch die sauren Eigenschaften verloren; es wird in der Kälte weder von verdünnter noch mäßig konzentrierter Salzsäure, noch von n/10- und n-Natronlauge gelöst.

Es empfiehlt sich (l. c. Seite 2456) für die Darstellung der  $\beta$ -Modifikation beim Auswaschen der Tonerde die erste Nachbehandlung mit Ammoniak beim 4. Dekantieren unter Verwendung von 80 cm<sup>3</sup> 20proz. Ammoniak für 500 g Aluminiumsulfat vorzunehmen und 6 Stunden bei 20° dauern zu lassen und beim 8. Dekantieren, wobei die Waschflüssigkeit wieder trübe zu werden beginnt, eine zweite Nachbehandlung mit 30 cm<sup>3</sup> Ammoniak auszuführen. Das Dekantieren ist zweckmäßig so zu beschleunigen, daß das Auswaschen in 2 Tagen beendet ist.

Darstellung des Tonerde-Gels von der Formel  $AlOOH$ .

Werden die Orthohydroxyde des Aluminiums und andere Tonerde-Gele mit Ammoniak unter rascher Steigerung der Temperatur im trockenen Luftstrom auf 250° erhitzt, so bildet sich aus den verschiedenen Gelen dasselbe neue, dessen Zusammensetzung mit guter Annäherung der Formel des Meta-Hydroxyds entspricht. Besser ist es, die wässerigen Suspensionen beliebiger Tonerdegele mit Ammoniak im Einschlußrohr rasch auf 250° zu erhitzen. Es bildet ein graustichiges, eher plastisches als flockiges Gel ohne basische oder saure Eigenschaften. Das Aluminium-Meta-Hydroxyd ist ein sehr schlechtes Adsorbens für Invertin; es dient zur Trennung von Saccharase und Maltase (vgl. S. 171). Durch Elution der adsorbierten Maltase (z. B. aus Hefe-Autolysaten) erhält man diese in fermentativ einheitlichem Zustande. Das Studium der Adsorptionsverhältnisse mit diesem Gel zeigt, daß „weder elektropositive oder -negative Art, noch Oberflächenwirkung bestimmend ist, sondern es sind Affinitätsverhältnisse, die noch nicht genau definiert werden können, verantwortlich für so ausgeprägt selektive Adsorption“<sup>1)</sup>.

Was das Kaolin als Adsorbens betrifft, so sei hier die Behandlung des Kaolins mit Salzsäure nach Willstätter und Schneider<sup>2)</sup> mitgeteilt.

1) Willstätter, Kraut und Erbacher: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 58, S. 2458. 1925.

2) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 133, S. 200. 1924.

500 g Kaolin werden mit 1,5 l reiner Salzsäure vom spez. 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.

Beispiele für die auswählende Adsorption und Elution findet man im spez. Teil für Lipasen (S. 113), Karbohydrasen (S. 160, 163, 170), Proteasen (S. 279, 319, 324).

### Dialyse und Filtration.

Reinigung durch Dialyse. Ein weiteres Hilfsmittel zur Reinigung von Fermenten bietet die Dialyse, bei der die Fermente

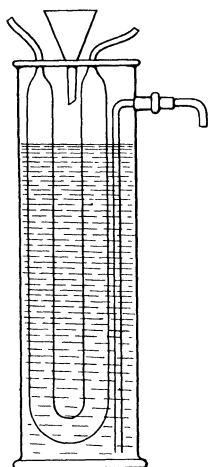


Abb. 1.

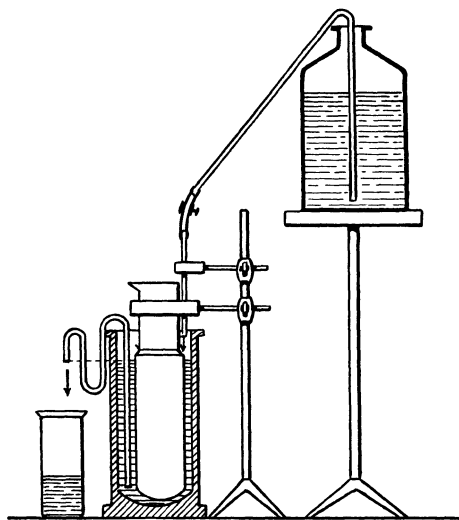


Abb. 2. (Nach Wiechowski, Hofmeisters Beitr. 9, S. 243, 1907.)

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 Kollodium solche wie folgt her.

Aus Filtrierpapier hergestellte Extraktionshülsen von Schleicher & Schüll werden durch Angefeuchtet, das überschüssige Wasser wird entfernt. Ehe die Hülsen erkaltet sind, werden sie mit Kollodium (z. B. D. A. B. 4proz.) 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—30 Min. Wässern ist der Dialysator gebrauchsfertig. Verwendet man verdünntere, z. B. nur 2proz. Kollodiumlösung (hergestellt durch Verdünnen der käuflichen Lösung mit dem gleichen Volumen einer Mischung von 7 Teilen Äther und 1 Teil absolutem Alkohol), so erhält man weniger dichte und daher schneller wirkende Dialysatoren. Man prüft 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

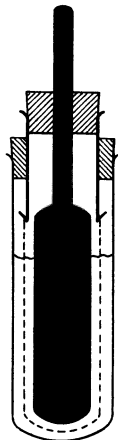


Abb. 3. Ein geschlossenes Glasgefäß oder eine Glasstange steckt im Innern der Kollodiumhülse. Dadurch wird die relative Oberfläche der dialysierenden Flüssigkeit vergrößert; ferner kann ihr Niveau gut geregelt werden. (Anordnung von Dr. Iwasaki; vgl. auch Abb. 72, S. 216.)

<sup>1)</sup> Nach Ostwald: Kleines Praktikum der Kolloidchemie. 7. Aufl., S. 25. 1930.

<sup>2)</sup> Michaelis-Rona: Praktikum. 4. Aufl., S. 88. 1930. Ein gutes Kollodium liefert die Chem. Fabrik auf Aktien (vorm. E. Schering Berlin N.

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<sup>1)</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 od. dgl.) 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 letztem Verfahren auftretenden Schwierigkeiten bei der Ablösung der Hülsen von der Unterlage sind durch den Kunstgriff der Gelatinierung des Glases nach Gates<sup>2)</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—2mal etwas weiter ein, als nachher die Kollodiumhülse reichen soll. Hierdurch wird das enge Loch am unteren Ende der Röhre mit Gelatine verschlossen, ebenso überzieht sich der ganze 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

---

<sup>1)</sup> Über Darstellung von Kollodiummembranen vgl. auch Asheshov: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 92, S. 362.

<sup>2)</sup> Gates: Journ. of exp. med. Bd. 35, S. 635. 1922 nach Trendelenburg: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 199, S. 237. 1923, und mündliche Mitteilung von H. H. Weber.

durch Schrumpfung reißt, da sonst Kollodium dort in das Glasrohr eindringt und die Ablösung der fertigen Hülse 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 4proz. 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 90—95proz. Alkohol (zu etwa 40 %). 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 Hülse genügend dickwandig und bis zu dem oben angegebenen Grad getrocknet, so stellt man das Glasrohr in zimmerwarmes Wasser und füllt auch sein Lumen damit. Dann erwärmt man bis etwa 40°, 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 Wassers 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 Hülsenkörper 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 Hülsenkörpers 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. glyzerinhaltigen Organauszuges von beigemengten Organteilchen durch gewöhnliche Filtration oder durch Zentrifugieren erfolgt, ist es bei der Reinigung der Fermente oft erwünscht, die Lösung möglichst voll-

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

ständig, und möglichst schnell von Elektrolyten zu befreien. Dazu dient hauptsächlich die Elektrodialyse (vgl. S. 15). In diesem Zusammenhang 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 prüft 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 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 für Nachtblau dichte 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, ganz bleibt. Das Filter *a* wird nun fest an den Trichter (von etwa 5,5 cm Durchmesser) und an die in

---

<sup>1)</sup> Aus Ostwald: Praktikum. 4. Aufl., S. 20 ff.

den Trichter gelegte Siebplatte angelegt, indem man in der in Abb. 4 angedeuteten Weise faltet. Man befeuchtet dann das Filter mit destilliertem Wasser und saugt an der Wasserstrahlpumpe scharf ab, nachdem man das Filter an einer Saugflasche oder besser

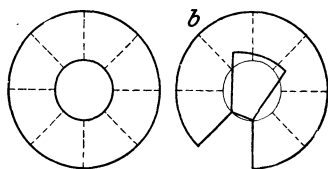
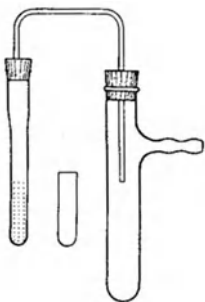
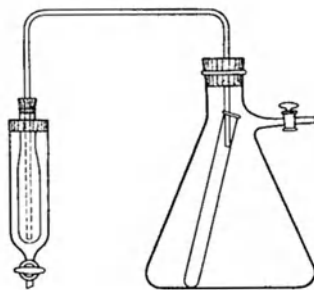


Abb. 4.

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 Wasser unter Toluol liegen.

Eintauchfilter nach Giemsa<sup>1)</sup>. Die Apparatur (Abb. 5, 6) besteht im wesentlichen aus einem reagensglasförmigen Porzellan-

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.

zylinder, einer dazu passenden Hülse aus Filtrierpapier (die man auch selbst herstellen kann) und der eigentlichen Filtriermembran.

Der Zylinder ist außen und innen glasiert und in seinem unteren, geschlossenen Teil siebartig durchbohrt. Die Filtrierhülse dient

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 132, S. 488. 1922.



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 durchlochenden Teil des Zylinders hinaus. Sodann wird die Hülse gut mit Wasser angefeuchtet, und das überschüssige Wasser durch Rollen der Hülse auf Filterpapier 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 Absaugrohr 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 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 Absaugrohr läßt man zweckmäßig dicht über dem Boden des Filtrierzylinders 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>. In der Regel wird 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>

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 144, S. 278. 1924.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 355. 1924.

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 220 Volt direkter Spannung ausgeführt werden. Bedingung ist, daß keine Reaktionsänderungen in der Mittelzelle auftreten.

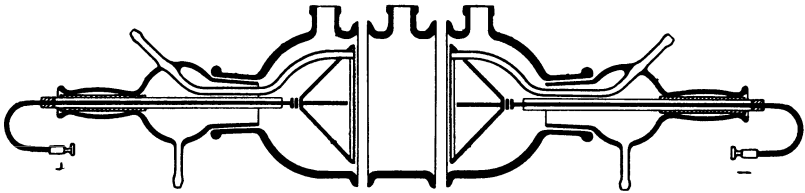


Abb. 7.

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 Platindrahtnetzelektroden, als Kathoden auch solche aus Silber- oder aus Kupferdraht verwendet. Die größeren Apparate, die nur zur Vorreinigung dienen, sind mit Graphitelektroden ausgestattet. Bei einiger Erfahrung lernt man es bald, mittels einer eingeschalteten, sehr schwach glühenden Lampe und Widerständen die

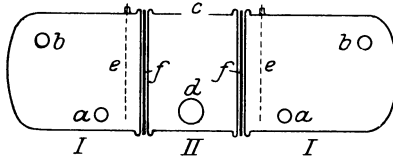


Abb. 8. I Außenkammer. II Mittelkammer, a Zufluß des Spülwassers, b Abfluß des Spülwassers, c Öffnung für den Rührer, d Abflußöffnung der Mittelkammer, e Elektroden, f Membranen.

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 Schlifsen 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

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

60 cm<sup>3</sup>, sie kann aber eine beliebige 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 Stromstärke 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  $\frac{1}{2}$ —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 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>.

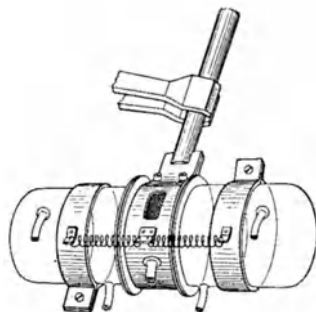


Abb. 9.

3. Einen einfachen Mikroelektrodialysierapparat beschreibt E. Baer<sup>2)</sup>.

Der Elektrodialyseapparat besteht aus drei ineinander geschobenen Glasröhren (1, 2, 3, Abb. 10), die ein dreizelliges System mit den Zellen *a*, *b*, *c* bilden. Die Abgrenzung der Mittelzelle *b* von den beiden äußeren Zellen (*a*, *c*) geschieht durch Membranen ( $M_1$ ,  $M_2$ ), die die unteren Öffnungen der beiden inneren Röhren verschließen. Für die äußere Röhre wird zweckmäßig einer der üblichen Kühlmäntel von 34,5 mm äußerer Weite, 120 mm Gesamtlänge und 60 mm Abstand zwischen den Mitten der beiden Abflußröhren verwendet. Dann ergeben sich für die beiden inneren Glasröhren folgende Maße: Mittleres Rohr

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

<sup>2)</sup> Kolloid. Zeitschr. Bd. 46, 176. 1928. Über den Elektrodialysenapparat von Ettisch vgl. Prakt. II, S. 97.

95 mm Länge und 26,5 mm äußere Weite, inneres Rohr 110 mm Länge und 20,5 mm äußere Weite. Fixiert werden die beiden inneren Röhren gegenseitig und gegen die äußere Röhre durch schmal Gummiringe, die um die oberen Teile der Röhren herumgelegt werden. Es gelingt dann leicht, durch

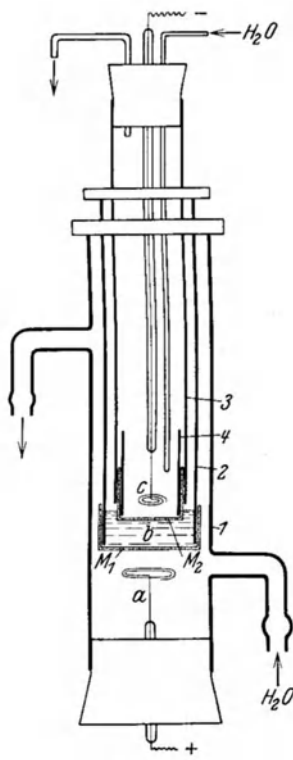


Abb. 10.

Verschieben der Gummiringe den Inhalt der Mittelzelle der jeweilig zu elektrodialysierenden Flüssigkeitsmenge (2—15 cm<sup>3</sup>) anzupassen. Dabei ist es zweckmäßig, den inneren Glaszylinder (3) immer so tief zu setzen, daß die Membran ca. 2 mm in die Flüssigkeit der Mittelzelle eintaucht.

Für die Wahl der Membranen bleiben die gleichen Gründe maßgebend wie bisher, da sich alle gebräuchlichen Membranarten mit gleicher Leichtigkeit an den Enden der Röhren befestigen lassen, wenn man beim Zurichten der Röhren darauf achtet, daß diese glatt abgesprengt und ohne Einfälle der Ränder rund geschmolzen werden.

Herstellung der Chrom-Gelatine-Anode. Aus einem rein wollenen Stoff oder sehr viel besser aus Crêpe-Georgette wird ein Kreisseibe ausgeschnitten, deren Durchmesser um ca. 3—4 cm größer ist als der Durchmesser der zu verschließenden Röhrenöffnung. Diese Stoffscheibe wird durch Überstreifen eines Gummiringes möglichst faltenlos auf dem einen Ende der mittleren Röhre (2) befestigt und nur der umgelegte auf Glas aufliegende Teil des Stoffes mit farblosem Zellonack getränkt. Nach dem Eintrocknen des Lackes wird der Lackauftr.

in derselben Weise noch einige Male wiederholt, wobei darauf zu achten ist, daß die eigentliche Membranfläche frei von Zellonack bleibt. Diese vorbereitete Röhre wird dann so oft in eine frisch hergestellte Chrom-Gelatine-Lösung<sup>1)</sup> eingetaucht, bis sich auf dem Crêpe Georgette eine genügend dicke Schicht von erstarrter Chromat-Gelatine gebildet hat. Die Schicht wird zweckmäßig noch durch Eingießen einer geringen Menge Chromat-Gelatine in das senkrecht gehaltene Rohr verstärkt. Darauf folgt eine etwa 1—2 tägige Belichtung der Membran in zerstreutem Tageslicht, 1 Stunde bedecktem Himmel, oder 2—3 stündige Belichtung in direktem Sonnenlicht. Nach dem Entfernen des überschüssigen Chromates aus der Membran durch Wässern und darauf folgender Elektrodialyse ist die Membran gebrauchsfertig.

<sup>1)</sup> Vgl. S. 17.

Zur Herstellung der Pergament-Membranen schneide man aus Pergamentpapier (Schleicher & Schüll, zur Dialyse) eine Scheibe aus, deren Durchmesser um ca. 2,5 cm größer ist als der Röhrendurchmesser selbst. Diese Scheibe wird angefeuchtet, auf die Mündung der senkrecht gehaltenen Röhre (3) gelegt und darauf ein kurzes ca. 3—4 cm langes Rohr gestellt, dessen äußerer Durchmesser so bemessen ist, daß es leicht in das Rohr 3 eingeführt werden kann. Dieses Rohr schiebt man mit dem Pergament so durch das weitere Rohr hindurch, daß die sich bildende Pergamentfläche das andere Röhrendende um ca. 0,5 cm überragt. Zur Verhinderung des Eindringens von Spülwasser der Außenzelle (c) in die Mittelzelle (b) dichtet man den Raum zwischen den Glasröhren 3, 4 mit weißem Zellonlack ab. Zu diesem Zweck legt man über denjenigen Teil des Pergamentes, welcher dem vorgeschobenen Teil der inneren Röhre (4) aufliegt, einen Kranz des schwerflüssigen Zellonlacks und sorgt durch Senkrechtthalten der Röhre sowie Erzeugung eines geringen Unterdrucks mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe dafür, daß der Zellonlack in den zu dichtenden Zwischenraum eindringt.

Als Elektrode dienen zwei 5 cm lange und 0,4 mm dicke zu einer flachen Spirale aufgewickelte Platindrähte, die mit ihren Zuführungen in Glasröhren eingeschmolzen waren. Außerdem können in gleicher Weise für die Kathode Silberdraht oder versilberter Messingdraht verwendet werden. Auch kleine Bogenlampenkohlen können in manchen Fällen als Elektroden benutzt werden. Die Spülung der beiden Außenzellen geschieht zweckmäßig aus einer höhergestellten, ca. 5 l fassenden Flasche mit destilliertem Wasser. Der Zufluß des Spülwassers wird so reguliert, daß anfangs von beiden Außenzellen pro Sekunde ein Tropfen abfällt. Später kann die Spülgeschwindigkeit verlangsamt werden.

Als Dauerbelastung der Zelle ist 25—30 Milliampere zulässig. Infolge der im Anfang meist guten Leitfähigkeit der Mittelflüssigkeit ist es notwendig, die Stromstärke durch Vorschaltwiderstände, Glühlampen oder Flüssigkeitswiderstände zu regulieren. Als sehr brauchbar und billig hat sich ein Flüssigkeitswiderstand erwiesen, welcher aus zwei  $4 \times 12$  cm großen Messingblechen, einem  $400 \text{ cm}^3$  Becherglas und destilliertem Wasser besteht. Durch Veränderung des Elektrodenabstandes sowie der Wassermenge kann man alle verlangten Widerstände herstellen<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

---

<sup>1)</sup> Über einen einfachen Elektrodialysierapparat aus einem Stück (geliefert von den Schott-Werken, Jena) vgl. Reiner: Zeitschr. physik. Chem. Bd. 35, S. 423. 1931.

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>1)</sup>. Es wird in derselben Konzentration angewandt wie das Toluol. Thymol ist auch gut verwendbar (einige Kristalle 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>2)</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. 21 ist eine solche geometrische Reihe, die die verschiedenen Potenzen der dazu gehörigen Zahl der linken Kolumne enthält<sup>3)</sup>.

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

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

oder nach Potenzen von  $2/3$  geordnet

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

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

<sup>1)</sup> Oppenheimer-Kuhn: Die Fermente. S. 74.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu Michaelis-Rona: Praktikum. 4. Aufl., S. 1.

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

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	0,0078	0,0039
0,6	1,00	0,600	0,360	0,216	0,130	0,0778	0,0467	0,0280	0,0170
0,7	1,00	0,700	0,490	0,343	0,240	0,168	0,118	0,0824	0,0576
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								

## Chemische Methoden.

Die bei der Untersuchung mit Fermenten anzuwendenden chemischen Methoden sind im speziellen Teil ausführlich geschildert. Im besonderen seien hier erwähnt: Enteiweißung (S. 336), titrimetrische Methoden (S. 237), mikro-gravimetrische Methoden (S. 146), Mikro-Kjeldahl-Bestimmung (S. 334), gasanalytische Methoden (S. 132, 294), Mikro-Zuckerbestimmung (S. 184, 189, 191), Bestimmung der Aminosäuren (S. 305, 312).

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

## Physikalische Methoden.

### Polarimetrie.

Für die Fermentmethodik kommt die Polarimetrie hauptsächlich in Betracht bei der Bestimmung der kohlehydratspalten- den Fermente, aber auch bei den polypeptid- und esterspalten- den Fermenten und bei den Nukleasen 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 Hindurch- sehen scharf unterscheiden können. Zum Verschuß der Röhren dienen aufschraubbare Kappen aus Metall, die eine kleine Glas- scheibe mit einem Gummiring fest gegen die Rohrmündung drücken. Zweckmäßig sind Röhren, die eine kleine Ausbuch- tung tragen, die zur Aufnahme etwa eingeschlossener Luft- blasen dient. Für Beobachtungen bei bestimmter Temperatur

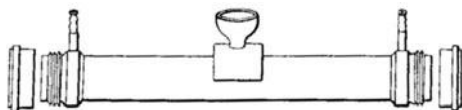


Abb. 11.

dienen Röhren mit Wassermantel (Abb. 11). Die beiden Aufsätze dienen zum Zu- und Abfluß des Wassers von bestimmter Tem- peratur. 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 Wellen- länge, 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 an- gegebene Lampe (Abb. 12). Diese Lampen sind so aufzustellen, daß nur das Licht aus dem oberen Teil des Ausschnittes des Schutz- schirmes zu dem Apparat gelangt<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Eine ausgezeichnete Lichtstärke liefert selbst noch bei 4 dm-Rohr die Osram-Punktlanpe in Verbindung mit dem Zeisschen Mono- chromator. Winkel-Zeiss (Göttingen) liefern neuerdings Spezial-Gelatine- Gelbfilter, das in Verbindung mit einer starken elektrischen Glühlampe genügend helles monochromatisches gelbes Licht liefert, das als Ersatz für Natriumlicht verwendet werden kann.



Die optische Einrichtung eines der gebräuchlichsten Halbschatten-Polarisationsapparate ist in Abb. 13 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 14—16 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 Analysatornicol  $N_3$  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 (siehe Abb. 14); dann ist die Schwingungsrichtung  $oa$  des von  $N_3$  hindurchgelassenen Lichtes senkrecht zu  $ol$ . Hierauf dreht man  $N_3$ ,

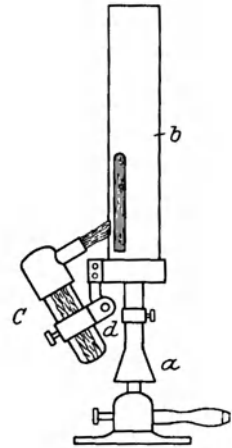


Abb. 12.  
Lampe nach Airila und Komppa.  $a$  Teclu-Brenner,  $b$  Metallzylinder mit seitlichem Einschnitt,  $c$  10 cm hohes Glasgefäß mit aufgesetzter Metallkappe, zu  $\frac{2}{3}$  mit 3 proz. Na Cl-Lösung gefüllt, in der Asbestdocht steckt. Letzterer aus der Tülle heraustretend, ist im Winkel von  $45^\circ$  geschnitten. Vor jedesmaliger Benutzung muß die gebildete Salzkruete und das hart gewordene Dochtende abgeschnitten werden,  $d$  Scharnier zum Herausbewegen des Dochtes durch den Spalt an den Rand des Flammenkegels.



Abb. 13.

bis das andere Feld vollkommen ausgelöscht ist, wie Abb. 16 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. 15). Auf diese gleich schwache

Beleuchtung benachbarter Vergleichsfelder wird bei allen Halbschattenapparaten eingestellt.

Die Handhabung des Apparates mit dreiteiligem Gesichtsfeld ist ganz ähnlich der des Halbschattenpolarimeters. Hier ist

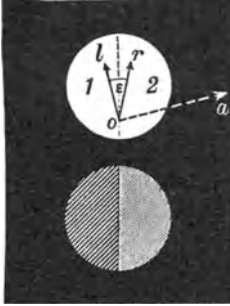


Abb. 14.

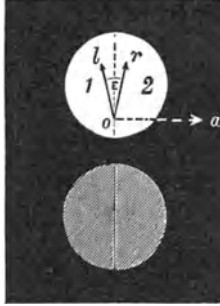


Abb. 15.

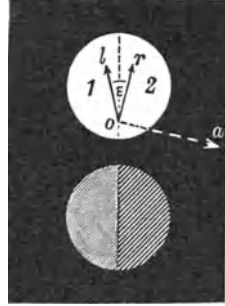


Abb. 16.

das Gesichtsfeld dreiteilig (vgl. Abb. 17). Die beiden äußeren Felder korrespondieren miteinander und sind mit dem inneren Feld auf gleiche Helligkeit mit Hilfe der Grob- und Feineinstellung zu bringen. Die Firma Schmidt und Haensch liefert auch diesen Apparat in Verbindung mit Vorrichtung zur Erzeugung des D-Lichtes. (Das Licht einer hellen Glühbirne wird durch ein Prisma in ein Spektrum zerlegt; nur das D-Licht wird in den Apparat geschickt, das außerdem noch durch ein Filter läuft, das nur Licht von  $573-606 \mu$  durchläßt. Die D-Linie des Na-Lichtes hat  $589 \mu$ .)

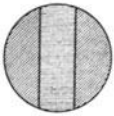


Abb. 17.

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

Die optische Einrichtung des Apparates (Abb. 18) 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 Dop-

pelte 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

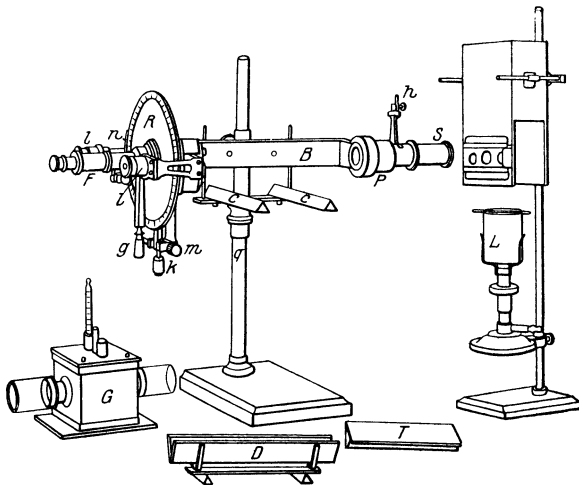


Abb. 18.

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 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 Apparatende beträgt 22 cm.

Ausführung von Bestimmungen: Man mißt im Dunkenzimmer. 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-

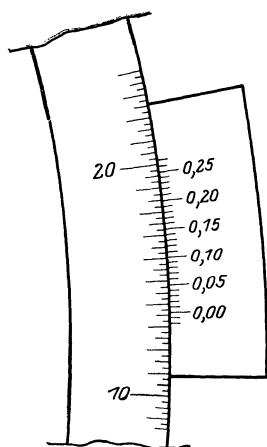


Abb. 19.

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, wobei die Winkel oberhalb des Nullpunktes einem rechtsdrehenden Substrat mit  $+$ -Vorzeichen zugerechnet werden, unterhalb des Nullpunktes einem linksdrehenden Substrat.

Ablesung der Gradteilung: Abb. 19 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 ge-

löst, bei einer Rohrlänge von 1 dm bewirkt. Die spezifische Drehung wird mit  $[\alpha]$  und die auf Natriumlicht und eine Temperatur von z. B.  $20^{\circ}$  sich beziehende mit  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  bezeichnet. Enthält die Flüssigkeit nur eine optisch aktive Substanz, so ist  $[\alpha] = \pm \frac{\alpha}{cl}$ , wobei  $\alpha$  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 bezeichnet.

Handelt es sich darum, die Änderungen der spez. Drehung bei verschiedenen Konzentrationen festzustellen, so ist es nötig, den Gehalt der Substanz in Grammen in 1 g der Lösung ( $p$ ) und das spez. Gewicht der Lösung ( $d$ ) bei  $20^{\circ}$  (bezogen auf Wasser von  $4^{\circ}$  als Einheit) zu kennen, um die spez. Drehung  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  nach der Formel  $\pm \frac{\alpha}{p \cdot l \cdot d}$  zu berechnen. Mit dem molekularen Drehungsvermögen  $[M]_{\text{D}}$  eines aktiven Substrats bezeichnet man das mit dem Molekulargewicht  $m$  multiplizierte und durch 100 dividierte  $[\alpha]_{\text{D}}$  desselben Körpers, entsprechend der Formel:

$$[M]_{\text{D}} = \frac{m \cdot [\alpha]_{\text{D}}}{100}.$$

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

$$c = \frac{100 \alpha}{[\alpha] \cdot l} = \frac{1,894 \alpha}{l}, \text{ bei Anwendung einer 2-dm-Röhre ist } c = 0,947 \alpha.$$

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

$$c = 1,504 \frac{\alpha}{l} \text{ bei Anwendung einer 2-dm-Röhre} \\ c = 0,752 \alpha.$$

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

Der Traubenzucker zeigt „Mutarotation“: Gleich nach der Auflösung in kaltem Wasser zeigt  $\alpha$ - $d$ -Glukose  $[\alpha]_{\text{D}}$  etwa  $+ 105^{\circ}$  (nach Wittig, Stereochemie S. 86  $+ 113,4^{\circ}$ ),  $\beta$ - $d$ -Glukose etwa  $+ 22^{\circ}$  (nach Wittig, l. c. S. 86  $+ 19^{\circ}$ ); beim Stehen, rascher beim Erhitzen stellt sich bei beiden das angegebene konstante Drehungsvermögen ein. Die Temperaturempfindlichkeit des  $[\alpha]_{\text{D}}$  der Glukose ist gering.

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

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

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

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

Maltose:  $[\alpha]_{\text{D}}^t = + 140,4^{\circ} - 0,0184 p - 0,095 t$ , für  $p = 4$  bis  $35$  und  $t = + 15$  bis  $35^{\circ}$  gültig (s. auch S. 194).

## 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, gar nicht 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 Brechungsindex  $n$  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

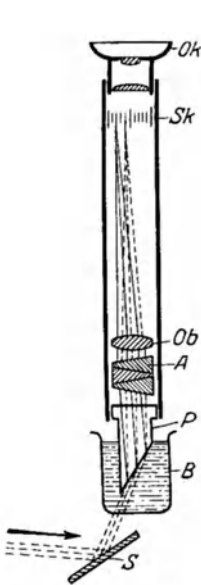


Abb. 20.

selbst dar. Bei einigen Untersuchungen werden die abgelesenen Skalenteile in die wirklichen Brechungsindizes umgerechnet.

Der Gang der Lichtstrahlen im Refraktometer ist aus der Abb. 20 ersichtlich. Die von einem Spiegel  $S$  aufgefangenen Strahlen treten, das Prisma  $P$  streifend, in die Flüssigkeitsschicht und erfahren hier eine Ablenkung, indem sie ins Hauptprisma  $P$  eintreten. Der Winkel, den sie hier-

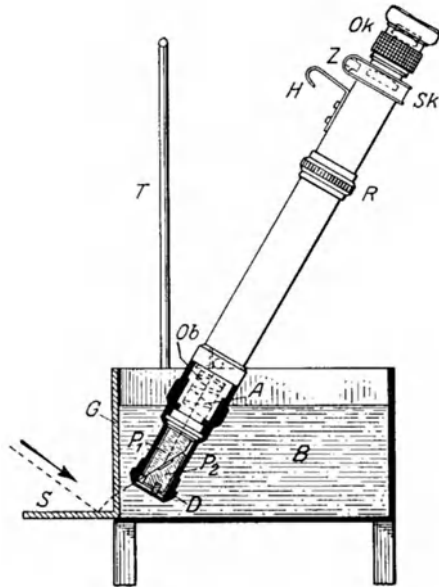


Abb. 21. Untersuchung einer Flüssigkeit unter Luftabschluß mit dem Eintauchrefraktometer ( $\frac{1}{5}$  nat. Größe). Die Substanz ist zwischen dem Prisma  $P_1$  und dem Hilfsprisma  $P_2$  in dem metallenen Becher enthalten. Das vom hellen Himmel oder einer Lampe kommende Licht fällt auf den Spiegel  $S$  und tritt durch 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.

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

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. 21).

Das Eintauchrefraktometer selbst besteht im wesentlichen aus folgenden Teilen:

1. dem Prisma  $P$ ,
2. dem aus dem Objektiv  $Ob$  und dem Okulare gebildete Fernrohr mit der Skala  $Sk$  und einer Mikrometerschraube  $Z$
3. dem zwischen dem Prisma  $P$  und dem Objektiv  $Ob$  angeordneten Kompensator  $A$  (dreiteiliger Amici'scher Prismensatz), der mittels des Ringes  $R$  gedreht werden kann. Durch Drehen des Kompensators an dem Ring  $R$  macht man den durch Dispersion farbigen Saum, der den hellen Teil des Gesichtsfeldes von dem dunklen Teil trennt, zu einer farblosen, scharfen Trennungslinie zwischen Hell und Dunkel.

Die Lage dieser scharfen Grenze in der Skala ist das Maß für den Brechungsindex der zu untersuchenden Substanz. Die ganze Skalenteile werden abgelesen und notiert; zur Ermittlung der Zehntel-Skalenteile dient die Mikrometerschraube  $Z$ .

Tabelle für die Umrechnung der Skalenteile des Eintauchrefraktometers in Brechungsindizes  $n_D$  und umgekehrt (Prisma 1).

Skalenteil	$n_D = 1,3$		Skalenteil	$n_D = 1,3$		
— 5	25 39	40	10	31 26		
— 4	25 78		11	31 65		
— 3	26 18		12	32 04		
— 2	26 57		13	32 42		
— 1	26 96		14	32 81		
0	27 36	4,0	15	33 20	39	
1	27 75	3	16	33 58	1	3,9
2	28 14	4	17	33 97	2	7,8
3	28 54	5	18	34 35	3	11,7
4	28 93	6	19	34 74	4	15,6
5	29 32	7	20	35 13	5	19,5
6	29 71	8	21	35 51	6	23,4
7	30 10	9	22	35 90	7	27,3
8	30 49		23	36 28	8	31,2
9	30 87		24	36 67	9	35,1



(Fortsetzung der Tabelle von S. 30.)

Skalenteil	$n_D = 1,3$		Skalenteil	$n_D = 1,3$	
25	37 05		65	52 05	
26	37 43		66	52 42	
27	37 81		67	52 79	
28	38 20		68	53 16	
29	38 58		69	53 52	
30	38 96		70	53 88	
31	39 34		71	54 25	
32	39 72		72	54 61	36
33	40 10		73	54 97	1 3,6
34	40 48		74	55 33	2 7,2
35	40 86		75	55 69	3 10,8
36	41 24	38	76	56 06	4 14,4
37	41 62	1 3,8	77	56 42	5 18,0
38	41 99	2 7,6	78	56 78	6 21,6
39	42 37	3 11,4	79	57 14	7 25,2
40	42 75	4 15,2	80	57 50	8 28,8
41	43 13	5 19,0	81	57 86	9 32,4
42	43 50	6 22,8	82	58 22	
43	43 88	7 26,6	83	58 58	
44	44 26	8 30,4	84	58 94	
45	44 63	9 34,2	85	59 30	
46	45 00		86	59 66	
47	45 37		87	60 02	
48	45 75		88	60 38	
49	46 12		89	60 74	
50	46 50		90	61 09	
51	46 87		91	61 45	
52	47 24		92	61 81	35
53	47 61		93	62 17	1 3,5
54	47 98	37	94	62 52	2 7,0
55	48 36	1 3,7	95	62 87	3 10,5
56	48 73	1 7,4	96	63 23	4 14,0
57	49 10	3 11,1	97	63 59	5 17,5
58	49 47	4 14,8	98	63 94	6 21,0
59	49 84	5 18,5	99	63 94	7 24,5
60	50 21	6 22,2	100	64 64	8 28,0
61	50 58	7 25,9	101	65 00	9 31,5
62	50 95	8 29,6	102	65 35	
63	51 32	9 33,3	103	65 70	
64	51 69		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  $n_D = 1,33049 + 0,00027 = 1,33076$ .

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

Bei der Temperatur . . . . . °C	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 . . . . . °C	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

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<sup>1)</sup>: Man stelle den Temperiertrog 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. 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 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, 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 nebenstehende Refraktometerwerte an.

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

<sup>1)</sup> Im wesentlichen nach Hoppe-Seyler-Thierfelder. 9. Aufl. S. 31. Berlin: Julius Springer. 1924.

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 Grenzlinie 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  $17,5^{\circ}$  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. 22 zeigt.

Zur Untersuchung kleinerer Substanzmengen (Blutserum) oder gefärbter Flüssigkeiten bedient man sich des Hilfsprismas (vgl. Abb. 21, S. 29). Dazu wird ein beigegebener metallener Becher

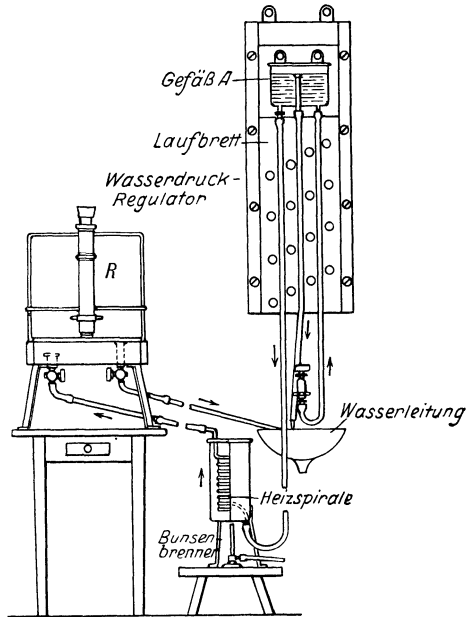


Abb. 22 (etwa  $\frac{1}{20}$  nat. Größe).

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 Abbildung der Beleuchtungsspiegel. Durch einen vollen Kreis ist der Pflöck bezeichnet, auf dem das Gefäß A tragende Brett ruht.

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.

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>. (Vgl. S. 342.)

### 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

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

<sup>2)</sup> Pregl u. de Crinis: Fermentforschung Bd. 2, S. 58. 1917. — Über andere Anwendungen vgl. Rostock: (Pepsinwirkung auf Fibrin) Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 39, S. 385. 1924 und Bd. 42, S. 132. 1924. — Reiß: (Pepsinbestimmung im Magensaft) Schweiz. med. Wochenschr. Bd. 29, III. 1923. — Kupelwieser u. 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: l. c. — Vgl. Berl u. Ranis: Die Anwendung der Interferometrie in Wissenschaft und Technik. Fortschr. d. Chem. u. Phys. u. phys. Chem. Bd. 19, H. 7. 1928.

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. 23) 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. 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

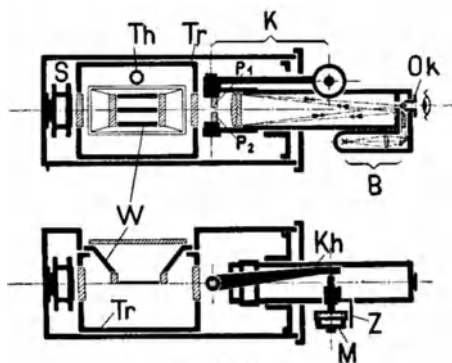


Abb. 23.

Okulars *Ok* betrachtet. Die Lichtstrahlen der parallelen Strahlenbündel müssen auf ihrem Wege zum und vom Spiegel *S* durch die Platten  $P_1$  und  $P_2$  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 Nullage dienende Interferenzstreifensystem. Dieses besteht aus einem weißen Felde, dem sog. Maximum nullter Ordnung, und symmetrisch dazu angeordneten Beugungserscheinungen, welche durch sehr schmale schwarze Minimastreifen 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  $P_1$  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. 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, 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 sorgfältigst mit Filtrierpapier ausgetrocknet. Ein Befechten der gekitteten 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 Beugungerscheinungen 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. 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 Lösung (resp. bekannte Konzentration) oder auch gegen einen käuflichen empirisch festzulegenden Trübungsstandard. Unter den unten ausgeführten Bedingungen gilt die Beziehung des Lambert-Beerschen Gesetzes: in einer Schicht trüber Lösung sind Schichthöhe  $d$  und Konzentration  $c$  an trübender Substanz umgekehrt proportional ( $c \cdot d = \text{konst.}$ ). Hierbei wird nicht, wie bei der Kolorimetrie, das durch die Lösung hindurchgesandte Licht gemessen, also die Menge des absorbierten Lichts, sondern das von den Teilchen ausgesandte abgebeugte Licht.

Durch Änderung der Höhe der Flüssigkeitssäule  $d_1$  läßt sich bei Vergleich gegen eine Trübung bekannter Schichthöhe  $d_2$  und Konzentration  $C_2$  die Konzentration  $C_1$  bestimmen:  $C_1 = \frac{d_2 C_2}{d_1}$ .

Apparatur: Hier soll nur eines der käuflichen Nephelometer, das nach Kleinmann<sup>2)</sup>, [hergestellt von Schmidt und Haensch, Berlin] beschrieben werden. Abb. 24 zeigt das Schema des Strahlenganges, Abb. 25 das Schema des Instrumentes selbst.

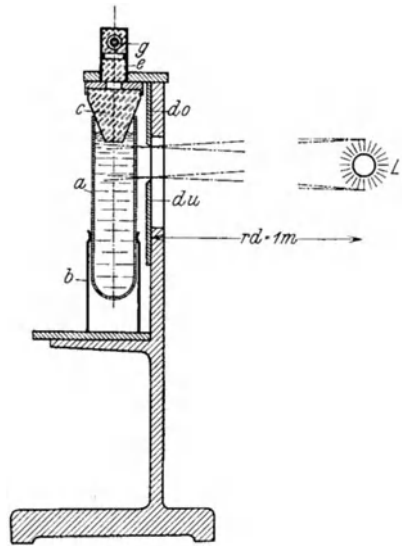


Abb. 24.

<sup>1)</sup> Vgl. S. 342.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 99, S. 115. 1919.

$a$  und  $a_1$  sind Reagensgläsern von  $17 \text{ cm}^3$  Fassungsvermögen, die zur Aufnahme der zu vergleichenden getrübbten Lösungen dienen. Dieselben werden von vorn beleuchtet und die entsprechenden Tyndallkegel von oben beobachtet. Zu diesem Zwecke

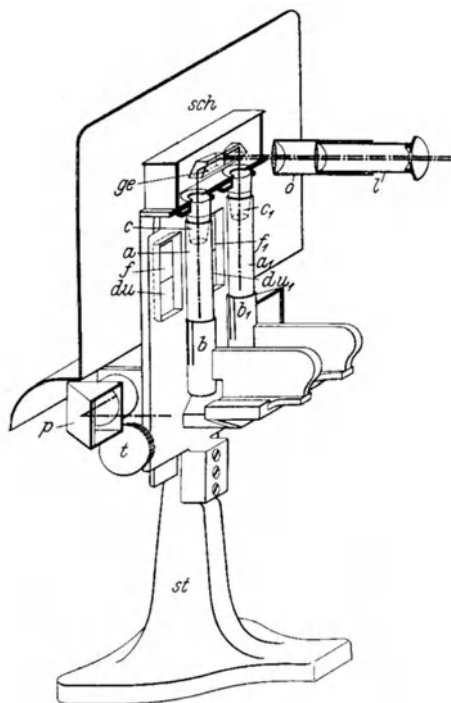


Abb. 25.

geht das Beugungslicht zuerst durch zwei massive Glaskonusse  $c$  und  $c_1$ . 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.

Die Höhen der dem Licht ausgesetzten Gefäße können mittels einer einfachen Schraubenbewegung beliebig geändert werden dadurch, daß durch bewegliche Metallplatten  $d_o$  und  $d_u$  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 Millimeterskala und Nonius auf  $0,1 \text{ mm}$  genau abzulesen.

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

Die Mikronephelometereinrichtung stellt einen Zusatzteil zu dem Nephelometer nach Kleinmann dar, die einfach eingefügt werden kann. Sie dient dazu, statt der Gefäße von  $17 \text{ cm}^3$  Fassungsvermögen solche von  $2,7$  und  $3,7 \text{ cm}^3$  Volumen anzuwenden. Als weitere Zusatzeinrichtungen zum Kleinmannschen Nephelo-



meter seien angeführt: Eine Einrichtung für sterile Messungen, sowie ein fester unveränderlicher aber in Farbe und Helligkeit variierbarer Trübungsstandard.

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 Gesichtsfelde 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 innerhalb bestimmter Grenzen 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  $d$  die Schichthöhe der bekannten Lösung, die man gewöhnlich auf den Mittelwert 20 annehmen wird,  $d_1$  die Stellung der unbekanntes Lösung bei gleicher Helligkeit im Gesichtsfelde,  $c$  die Konzentration der bekannten Lösung,  $x$  die der unbekanntes, so ist  $d : d_1 = x : c$ , also

$$x = \frac{c \cdot d}{d_1}.$$

Die Nephelometrie wurde bis jetzt bei der Untersuchung der Amylase (S. 203), des Pepsins (S. 265) und des Trypsins (S. 314) und der Gewebsproteinase angewandt.

### Kolorimetrie<sup>1)</sup>.

Prinzip: Das Lichtabsorptionsvermögen zweier Lösungen derselben Substanz ist das gleiche, wenn die Konzentration

<sup>1)</sup> Vgl. auch Praktikum II, S. 336.

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

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

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

Es besteht aus zwei nebeneinanderstehenden zylindrischen Röhren  $Z$ , von denen die eine die Lösung bekannten Gehalts, die andere die zu bestimmende Lösung enthält<sup>2)</sup>. Die Schichthöhe der Flüssigkeiten kann durch die Tauchzylinder  $T$ , welche unten durch eine Glasplatte verschlossen sind und mittels Triebsschrauben 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.

Kolorimeter 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 Skalenstellung 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 unbekannteren Lösung, darf nicht zu groß sein. Es darf kein nennenswerter Temperaturunterschied (höchstens bis 3°) zwischen den beiden

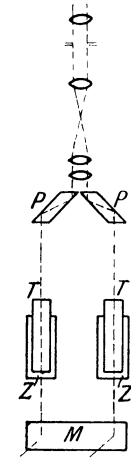


Abb. 26.

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

<sup>2)</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.

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<sup>1)</sup>.

### Viskosimetrie.

Die innere Reibung einer Flüssigkeit wird am einfachsten mit dem Viskosimeter nach Wilhelm Ostwald bestimmt<sup>2)</sup>. Die erhaltenen Werte sind relativ und werden auf die innere Reibung des Wassers = 1 bezogen. Da die Viskosität stark von der Temperatur abhängt, muß die Messung im Wasserbad ausgeführt werden<sup>3)</sup>. Das Viskosimeter (s. Abb. 27) muß stets mit der gleichen Menge Flüssigkeit gefüllt werden, die für jedes Viskosimeter ausprobiert werden muß. Man fülle aus einer Pipette so viel Wasser in das (breitere) Rohr *d* ein, daß die Kugel *c* knapp gefüllt ist. Nun blase man von *d* aus mittels eines Gummischlauches die Flüssigkeit in den anderen Schenkel, bis sie die Marke *1* erreicht. Sie muß dann auf der anderen Seite noch gerade in die Kugel *c* reichen. Diejenige Flüssigkeitsmenge, die diese Bedingung erfüllt, ist die geeignete. Das Wichtigste ist, daß das einmal gewählte Flüssigkeitsvolumen nunmehr stets innegehalten wird. Die Zeit wird mit einer Stoppuhr gemessen, die  $\frac{1}{5}$  Sekunden anzeigt. Sobald das Flüssigkeitsniveau die obere Marke *1* passiert, wird die Uhr angelassen, sobald es die untere Marke *2* passiert, gestoppt. Dann wird die Flüssigkeit wieder in den anderen Schenkel herübergedrückt und die Bestimmung wiederholt, und dies fortgesetzt, bis die Werte konstant werden. Bei Gelatinelösungen muß man das ganz besonders berücksichtigen, weil die Viskosität bei Änderung der Temperatur erst ganz allmählich ihren endgültigen Wert annimmt.

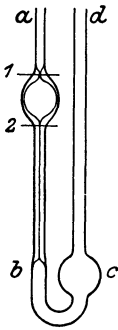


Abb. 27.  
Viskosimeter.  
 $\frac{1}{4}$  nat. Größe.

Zunächst wird durch mehrere Versuche der Wert für reines Wasser bei der für den eigentlichen Versuche gewählten Temperatur, z. B.  $35^{\circ}$ , festgestellt.

<sup>1)</sup> Über das Kolorimeter von Bürker (Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 36, S. 427. 1923) vgl. Prakt. II, S. 153.

<sup>2)</sup> Beschreibung und Handhabung des Viskosimeters von Hess vgl. Prakt. II, S. 16. Über viskosimetrische Messung der Fermentkonzentration (speziell der Amylasekonzentration) vgl. Thompson, Johnson und Hussey: Journ. General Physiology Bd. 15, S. 1. 1931.

<sup>3)</sup> Das ganze Viskosimeter (über der Marke *1*) muß ins Wasserbad eintauchen.

Bestimmung einer Fermentwirkung mit Hilfe der Viskosimetrie findet man auf S. 200 (Amylase) und auf S. 267 (Pepsin).

### Dilatometrie.

Dilatometrische Messungen, d. h. die quantitative Verfolgung von Volumänderungen in Reaktionsystemen sind zur quantitativen Verfolgung von Fermentprozessen geeignet, und zwar sowohl zur Verfolgung von Spaltungen als auch von Synthesen<sup>1</sup>). Das Volumen des Reaktionssystems (Substrat + Ferment) ändert sich proportional mit dem Fortschreiten des Fermentprozesses.

Eine für viele Zwecke geeignete Form eines Dilatometers zeigt Abb. 28. *k* ist eine Kapillare mit Millimeterteilung, deren Hohlvolumen (Kapillarinhalt) mit äußerster Sorgfalt mittels Quecksilbers geeicht wird. (Sie hat z. B. eine Höhe von 30 resp. 50 cm, einen Lumendurchmesser von 0,35—1,25 mm, ein Hohlvolumen von z. B. 40 mm<sup>3</sup>.) *a* ist der „Dilatometerkörper“, in den 2 Glasstäbe *S* eingebaut sind, die das Vermischen der Reaktionsflüssigkeit bewirken (siehe unten); *b* ist ein kleines Glassieb. Vom Schenkelhahn *c* bis zur *o*-Marke hat der Dilatometerkörper einen Inhalt von z. B. 10, 50, 100 cm<sup>3</sup>. — Es lassen sich natürlich auch andere Formen von Dilatometern konstruieren, z. B. kann man die Kapillare als Einzelstück herstellen und sie mittels eines Schlifffes auf den Dilatometerkörper aufsetzen; dies hat den Vorteil, daß man dieselbe Kapillare für verschiedene Dilatometer benutzen kann; ferner kann man für spez. Zwecke den Dilatometerkörper zweikammrig konstruieren usw.

Technik an Hand eines praktischen Beispiels: Spaltung einer 10proz. Saccharose-Lösung mittels Saccharase; gleichzeitig dilatometrische und optische Verfolgung des Fermentprozesses. Versuchstemperatur 30° ( $\pm 0,05^\circ$ ). — 4 Dilatometer werden in ein mit einem Toluolthermostaten konstant gehaltenes großes Wasserbad eingesetzt und mit einem geeigneten Klammersystem befestigt. Die Dilatometer werden mit ziemlich starkem Hub hin und her bewegt; durch diese Bewegung fallen die eingebauten Glasstäbe hin und her und besorgen auf diese Weise die ständige Vermischung der Reaktionslösung. In dasselbe Wasserbad wird getrennt je in einem Vorratskolben eine

<sup>1</sup>) Benrath: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 67, S. 501. 1908. — Van 't Hoff: Sitzungsber. d. königl. preuß. Akad. d. Wiss. Bd. 34, S. 963. 1910. — Galeotti: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 76, S. 105. 1911; Bd. 80, S. 241. 1912. — Sreenivasaya und Sastri: Biochem. Journal Bd. 23, S. 975. 1929. — Rona und Neuenschwander: Biochem. Zeitschr. Bd. 235, S. 214. 1931.

genau abgemessene Menge Zuckerlösung (vorher aufgeköcht, damit während des Versuchs keine Luftbläschen austreten!) und die Fermentlösung (zum selben Zwecke  $\frac{1}{2}$  Stunde evakuiert) eingesetzt, um sie auf die Versuchstemperatur zu bringen; ist dies der Fall, wird eine geeignete Menge der Fermentlösung mit der

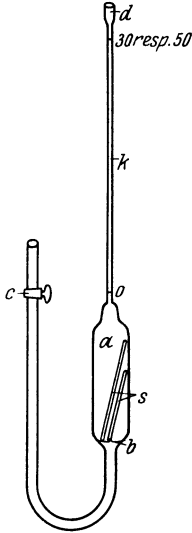


Abb. 28.

Zuckerlösung vermischt und nach Abnahme einer Probe sofort 2 Dilatometer gefüllt. Das Füllen geschieht durch Schlauchverbindung des Vorratskolbens (dieser bleibt während des ganzen Versuchs im Wasserbad) mit dem Hahnschenkel des Dilatometers (Abb. 28, c) und leichtes Saugen mit der Wasserstrahlpumpe am Kapillarende (*d*); die Füllung muß natürlich vollkommen luftblasenfrei sein. In Versuchen, bei denen eine Volumenabnahme eintritt, müssen die Kapillaren auch gefüllt werden; analog werden die beiden anderen Dilatometer gefüllt mit derselben Zuckerlösung und abgekochtem Ferment (oder mit Wasser) als Kontrollen; da in diesen Kontrollen an sich das Volumen absolut unverändert bleibt, können sie als Temperaturkorrekturen für die Schwankungen der Wasserbadtemperatur verwendet werden (die Schwankungen dürfen natürlich nur minimal sein). Wenn die Dilatometer gefüllt sind, wird kurze Zeit geschüttelt und dann die Steighöhenablesungen an der Kapillarskala begonnen.

Aus den Differenzen der Steighöhen wird die absolute Volumabnahme berechnet. Gleichzeitig mit den Steighöhenablesungen wird aus dem Vorratskolben eine bestimmte Menge der Reaktionslösung in eine gleiche Menge 2-n-Sodalösung abpipetiert und das  $\alpha_D$  davon bestimmt.

Beispiel eines Spaltungsverlaufes:

Dilatometer- und Kapillarovolumen	Zeit Min.	Steighöhenabnahme in cm	Volumenabnahme in mm <sup>3</sup>	Drehungsabnahme
Fassungsvermögen: 50 cm <sup>3</sup>	10	3,95	5,3	0,54
Inhalt der Kapillare: 40,5 mm <sup>3</sup>	20	7,60	10,3	1,02
(30 cm lang)	30	11,05	15,0	1,50
d. h. 1 cm entspr. 1,35 mm <sup>3</sup>	40	14,55	19,6	1,98
	50	17,70	23,9	2,46
	60	20,55	27,7	2,80
	70	23,45	31,7	3,24

Aus diesen Zahlen ergeben sich folgende Kurven:

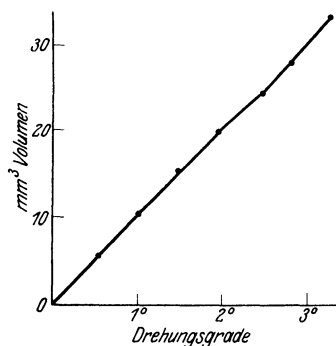


Abb. 29.

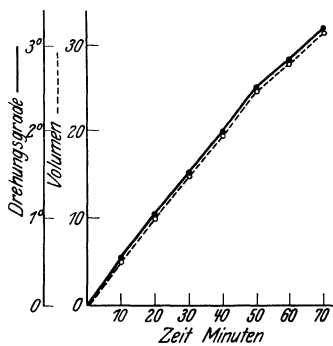


Abb. 30.

Abb. 29, Volumabnahme-/Drehungsabnahme-Kurve, ist praktisch eine Gerade; in Abb. 30 fallen die beiden Kurven, die Zeit-/Volum-Kurve und die Zeit-/Drehungsabnahme-Kurve bei geeigneter Wahl der Parameter zusammen. Der Versuch zeigt somit proportionalen Verlauf der Volumabnahme mit der Abnahme der Drehung, d. h. die Volumabnahme verläuft proportional der Saccharose-Spaltung; die Methode ist somit geeignet, fermentative Spaltungen (oder auch Synthesen) zu verfolgen<sup>1)</sup>.

## Konduktometrie.

Der Widerstand (bzw. sein reziproker Wert: die Leitfähigkeit) einer zu messenden Brückenlösung wird nach dem Prinzip der Wheatstoneschen Brückenordnung gemessen. Da sich die Anwendung von Gleichstrom bei Elektrolyten verbietet, wird nach Kohlrausch der Wechselstrom eines Induktors zu den Messungen benutzt, und die Stromlosigkeit der Brücke durch ein Telefon konstatiert.

Apparatur: Die Schaltung ist aus der Abb. 31 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> Auch die absoluten Werte der Volumabnahme pro Spaltung von 1 Mol Substrat sind von Bedeutung.

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

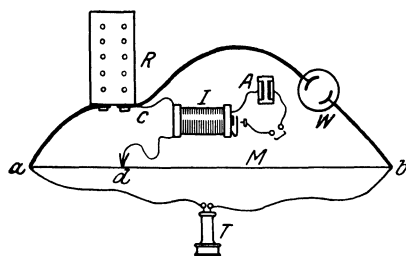


Abb. 31.

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.

$R$  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. 33. Dieser besteht aus einem Kondensator von 0,5 bis 2 Mikrofarad, der parallel zur Funkenstrecke geschaltet ist. Der Kondensator besteht aus zwei Aluminiumblechen, die in eine Sulfatlösung oder in Seifenwasser tauchen. Man kann 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. 32). 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 konzentrierter  $H_2SO_4$  + Bichromat gereinigt, sorgfältig gewässert und dann platinirt. 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 samt schwarz sein; bei Elektroden, die schon wiederholt platinirt 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. 288.

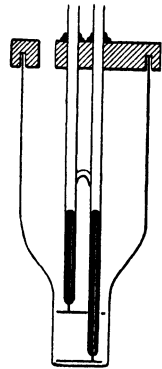


Abb. 32. Widerstandsgefäß.

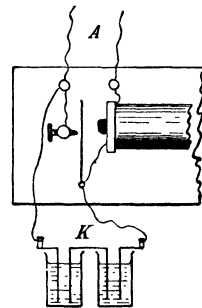


Abb. 33. Schaltung des Kondensators als Funkenzünder.  
(Aus Ostwald-Luther, 4. Aufl., S. 504.)

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

KCl-Normallösungen. Das KCl (pro analysi Kahlbaum) wird vor dem Versuch eine Zeitlang schwach geglüht, bis kein Krepitieren der Kristalle mehr hörbar ist; nach dem Erkalten im Exsikkator werden zur Herstellung einer 0,1-n-Lösung 7,46 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 1/10- oder einer 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  $w = r \frac{l}{q}$ , 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. 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 Leit-

fähigkeit  $\Delta = \kappa \varphi$ . 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:

$t^0$	$1/1\text{-n-KCl}$	$1/10\text{-n-KCl}$	$1/50\text{-n-KCl}$	$1/100\text{-n-KCl}$
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. 287) 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.  $k' = 0,4343 k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x}.$

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 ist die Geschwindigkeit 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 u. Rona: Praktikum. 4. Aufl., S. 231. 1930.

$x$  bedeutet hier die abgelesene Drehungsänderung. Ist  $+a$  die Anfangsdrehung,  $-b$  die Enddrehung, so ist  $b = 0,313 \cdot a$  (vgl. S. 193). 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  $t$  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 mit Hilfe der Formel der monomolekularen Reaktion nicht 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	$x$	$a - x$	$\frac{x}{(a - x)a} \frac{1}{t} = k \cdot 10^3$
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 wird sehr erleichtert, auch wenn diese nur selten geeignet sind, einen Einblick in das Wesen des Reaktionsablaufs zu gestatten.

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

## 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  $10^0$  die Geschwindigkeit verdoppelt bis verdreifacht.

Der Temperaturkoeffizient  $\frac{k_{t+10}}{k_t}$ , d. h. das Verhältnis der Reaktionskonstanten für zwei  $10^0$  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 Azidität.

(Aktivitäts- $p_h$ -Kurven.)

Die gestellte Aufgabe ist, quantitativ die Abhängigkeit des Umsatzes von der  $[H^+]$  (der Wasserstoffionen-Konzentration) zu bestimmen. 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.

In der Abbildung 34, 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.

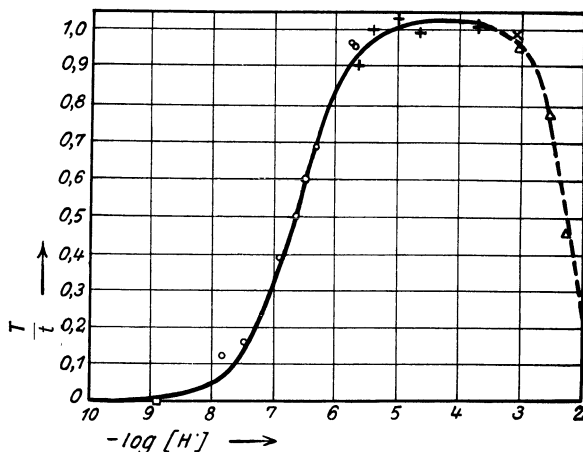


Abb. 34.

### 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.

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-

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

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



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  $150 \text{ cm}^3$  versetzt. Alle Flüssigkeiten werden im Wasserbade auf  $25,0 \pm 0,05^\circ$  gehalten. Die erste Probe wird so schnell wie möglich nach

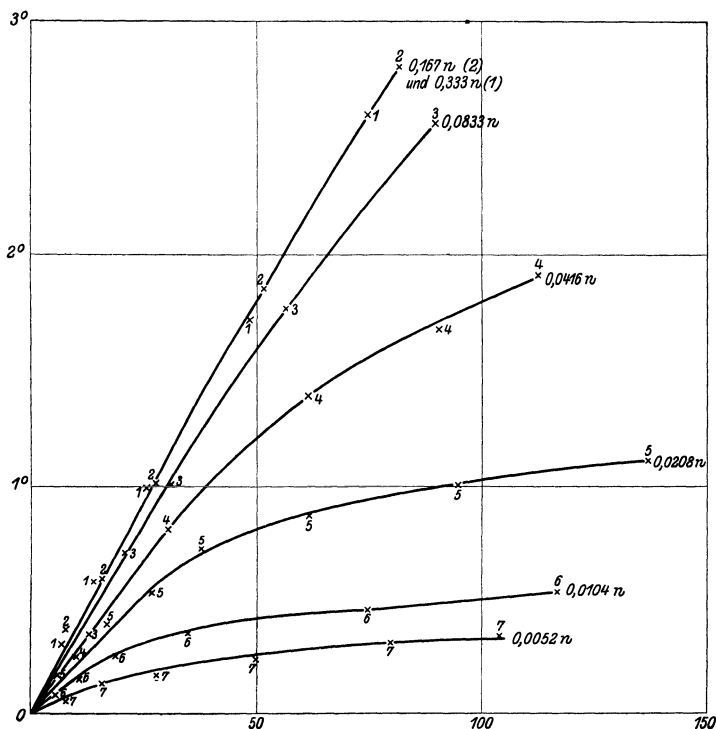


Abb. 35. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Abnahme der Drehung in Graden. Jede Kurve gilt für einen Versuch mit der angeschriebenen Anfangskonzentration von Saccharose. Fermentmenge überall gleich.

dem Vermischen der Flüssigkeiten und dann weitere Proben in geeigneten Abständen entnommen. Jede entnommene Probe von  $25 \text{ cm}^3$  wird zur Ausschaltung der Fermentwirkung und der Mutarotation in ein Gefäß mit  $3 \text{ cm}^3$  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.

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, Glukose und Fruktose zerfällt. Ferner wird angenommen, daß die Geschwindigkeit der Inversion proportional der jeweiligen Konzentration der Rohrzucker-Enzymverbindung ist. Für die Vereinigung von Ferment und Rohrzucker in stöchiometrischen Verhältnissen ergibt sich nach dem Massenwirkungsgesetz:

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

woraus

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

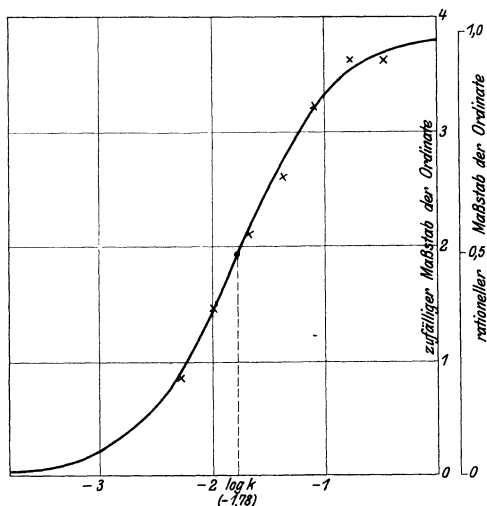
Hier bedeutet  $[S]$  die Konzentration des freien Rohrzuckers oder, da ja vom Rohr-

Abb. 36. Abszisse: Logarithmen der Anfangskonzentration der Saccharose. Ordinate: Die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung, ausgedrückt in Drehungsabnahme (in Graden), pro Zeiteinheit (Minute).

zucker 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 Fermentzucker Verbindung.  $[\Phi - \varphi]$  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  $v:0,576$  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 Ordinaten-system, 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.

Die Aktivitäts- $p_s$ -Kurven gestatten auch, über die Zersetzungsgeschwindigkeit der Fermentsubstratverbindung eine Aussage zu machen. Da nämlich die maximale Spaltungsgeschwindigkeit bei einer Substratkonzentration erreicht wird, bei der das gesamte Ferment an das Substrat gebunden ist, so ist diese Größe beim Vergleich zweier Aktivitäts- $p_s$ -Kurven miteinander ein Maß

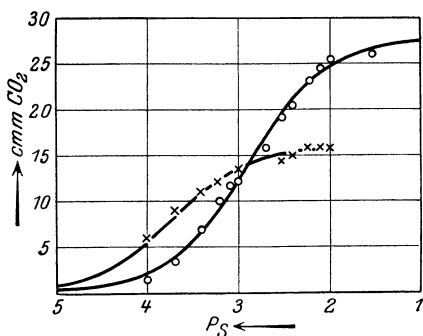


Abb. 37.

für die relativen Hydrolysenkonstanten der Fermentsubstratverbindungen.

Abb. 37 stellt die Aktivitäts- $p_s$ -Kurven dar, die bei der Hydrolyse der reinen d- und l-Mandelsäuremethylester erhalten wurden. Die Kurven sind gezeichnet für  $K_{(+)} = 10^{-3,75}$  und  $K_{(-)} = 10^{-2,90}$ . Das Verhältnis von  $K_{(-)} : K_{(+)}$  ist hier 7, d. h. also, daß das Ferment zur d-Modifikation des Mandelsäuremethylesters eine etwa 7mal so große Affinität hat wie zur l-Form. Das Verhältnis der Hydrolysenkonstanten der Ferment d- und l-Ester-Verbindungen beträgt

$\frac{28}{16} = 1:1,75$  zugunsten des l-Esters. Es zerfällt also die l-Ester-Fermentverbindung 1,75mal schneller als die andere diastereomere Form<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Über die Methodik der Aufstellung von Aktivitäts- $p_s$ -Kurven bei Esterasen siehe Weber und Ammon: Biochem. Zeitschr. Bd. 204,

## 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 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. 126 ff.

Über Enzymeinheiten vgl. im speziellen Teil für Lipase (S. 124, 127), Saccharase (S. 169), Amylase (S. 207), Maltase (S. 170), Emulsin (S. 173), Laktase (S. 176), Trypsin (S. 309), Enterokinase (S. 322), Erepsin (S. 328), Arginase (S. 356).

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

---

S. 202. 1929; Rona, Ammon und Werner: Ebenda Bd. 217, S. 42. 1930; Rona, Fischgold und Ammon: Ebenda Bd. 228, S. 77. 1920. — Diese Methode kann auch ganz allgemein benutzt werden, um Hemmungskörper oder Aktivatoren zu untersuchen. Vgl. z. B. Ammon und Fischgold: Biochem. Zeitschr. Bd. 234, S. 54. 1931.

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

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 einesteiis der allgemeinen chemischen Kinetik gehorcht und bei steigender Temperatur größer 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, von Begleitkörpern, Zusatzstoffen, chemischer Natur des Substrats und der Spaltprodukte.

Zur Konstanthaltung der Temperatur dienen Wasserbäder mit regulierbarer Heizung oder auch Warmluftbäder (Thermo-

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

<sup>2)</sup> Vgl. Euler: Chemie der Enzyme. 3. Aufl., S. 17. 1925.

stagen)<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 aus einer eintauchenden schräg abgeschnittenen Glasdüse 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 Indikatoren 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<sub>h</sub>*, der Wasserstoffexponent, ist der negative Logarithmus dieser

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

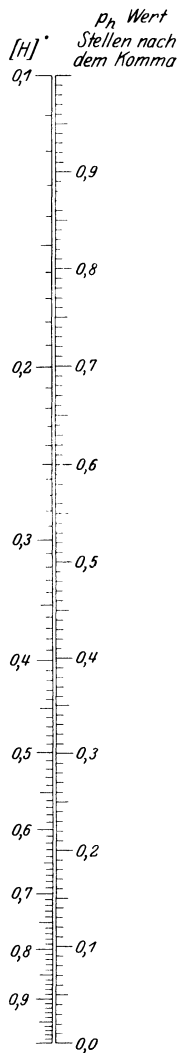


Abb. 38.  
Umrechnung  
von  $p_h$  und [H]  
ineinander.

<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-Azetat) oder auch Gemische von primären und sekundären 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	
	$[\text{H}^+]$	$p_h$	$[\text{H}^+]$	$p_h$	$[\text{H}^+]$	$p_h$	$[\text{H}^+]$	$p_h$	$[\text{H}^+]$	$p_h$
$\frac{1}{32}$	$1 \cdot 10^{-11}$	11,0	$5 \cdot 10^{-9}$	8,3	$6 \cdot 10^{-7}$	6,22	$5 \cdot 10^{-6}$	5,3	$3 \cdot 10^{-5}$	4,5
$\frac{1}{16}$	$2 \cdot 10^{-11}$	10,7	$1 \cdot 10^{-8}$	8,0	$1,2 \cdot 10^{-6}$	5,9	$1 \cdot 10^{-5}$	5,0	$6 \cdot 10^{-5}$	4,2
$\frac{1}{8}$	$4 \cdot 10^{-11}$	10,4	$2 \cdot 10^{-8}$	7,7	$2,5 \cdot 10^{-6}$	5,6	$1,8 \cdot 10^{-5}$	4,7	$1,3 \cdot 10^{-4}$	3,9
$\frac{1}{4}$	$8 \cdot 10^{-11}$	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
$\frac{1}{2}$	$1,6 \cdot 10^{-10}$	9,8	$1 \cdot 10^{-7}$	7,0	$1 \cdot 10^{-5}$	5,0	$7,5 \cdot 10^{-5}$	4,17	$5 \cdot 10^{-4}$	3,3
$\frac{1}{1}$	$3,2 \cdot 10^{-10}$	9,5	$2 \cdot 10^{-7}$	6,7	$2 \cdot 10^{-5}$	4,7	$1,5 \cdot 10^{-4}$	3,8	$1 \cdot 10^{-3}$	3,0
$\frac{2}{1}$	$6,4 \cdot 10^{-10}$	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
$\frac{4}{1}$	$1,3 \cdot 10^{-9}$	8,89	$8 \cdot 10^{-7}$	6,1	$8 \cdot 10^{-5}$	4,1	$6 \cdot 10^{-4}$	3,2	$4 \cdot 10^{-3}$	2,4
$\frac{8}{1}$	$2,6 \cdot 10^{-9}$	8,58	$1,5 \cdot 10^{-6}$	5,8	$1,6 \cdot 10^{-4}$	3,8	$1,2 \cdot 10^{-3}$	2,9	$1 \cdot 10^{-2}$	2,0
$\frac{16}{1}$	$5 \cdot 10^{-9}$	8,3	$3 \cdot 10^{-6}$	5,5	$3,2 \cdot 10^{-4}$	3,5	$2,4 \cdot 10^{-3}$	2,61	$2 \cdot 10^{-2}$	1,7
$\frac{32}{1}$	$1 \cdot 10^{-8}$	8,0	$6 \cdot 10^{-6}$	5,2	$6,4 \cdot 10^{-4}$	3,19	$5 \cdot 10^{-3}$	2,3	$4 \cdot 10^{-2}$	1,4

1) Vgl. Michaelis u. Rona: Praktikum. 4. Aufl., S. 24.



## Standardlösungen von Sörensen (Ergebnisse der Physiologie Bd. 12, S. 393. 1912).

Verwendete Flüssigkeiten. 1. 0,1 n-HCl. 2. 0,1 n-NaOH. 3. 0,1 m-Glykokoll + 0,1 n-NaCl. (7,505 g Glykokoll und 5,85 g reines Natriumchlorid im Liter. Diese Lösung wird unten „Glykokoll“ genannt.) 4.  $\frac{1}{15}$  mol. primäres Kaliumphosphat (9,078 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in 1 Liter wässriger Lösung. 5.  $\frac{1}{15}$  mol. sekund. Natriumphosphat (11,876 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) in 1 Liter. 6. 0,1 molare Lösung von sekund. Natriumzitat. 21,01 g Zitronensäure löst man in 200 cm<sup>3</sup> karbonatfreier n-NaOH und füllt mit Wasser auf 1 Liter auf. (In der Tabelle „Zitrat“ genannt.) 7. 0,2 mol. (12,40 g) Borsäure in 100 cm<sup>3</sup> n-NaOH gelöst mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. (In der Tabelle „Borat“ genannt.)

Die Phosphatlösungen sind mit (durch Aufkochen)  $\text{CO}_2$ -frei gemachtem destilliertem Wasser anzufertigen und die Lösungen unter Natronkalkverschluss zu halten.

## Glykokollmischungen:

			$p_h$				$p_h$
10,00 cm <sup>3</sup> Glykokoll	+	0,10 cm <sup>3</sup> HCl	ca. 6,106	10,00 cm <sup>3</sup> Glykokoll	+	0,10 cm <sup>3</sup> NaOH	ca. 6,106
9,90 „	„	„	ca. 4,411	9,90 „	„	„	ca. 7,809
9,75 „	„	„	ca. 3,991	9,75 „	„	+ 0,25 „	ca. 8,237
9,50 „	„	„	3,679	9,50 „	„	+ 0,50 „	8,575
9,00 „	„	„	3,341	9,00 „	„	+ 1,00 „	8,929
8,00 „	„	„	2,922	8,00 „	„	+ 2,00 „	9,364
7,00 „	„	„	2,607	7,00 „	„	+ 3,00 „	9,714
6,00 „	„	„	2,279	6,00 „	„	+ 4,00 „	10,140
5,00 „	„	„	1,932	5,50 „	„	+ 4,50 „	10,482
4,00 „	„	„	1,645	5,10 „	„	+ 4,90 „	11,067
3,00 „	„	„	1,419	5,00 „	„	+ 5,00 „	11,305
2,00 „	„	„	1,251	4,90 „	„	+ 5,10 „	11,565
1,00 „	„	„	1,146	4,50 „	„	+ 5,50 „	12,095
„	„	„	1,038	4,00 „	„	+ 6,00 „	12,399
„	„	„	„	3,00 „	„	+ 7,00 „	12,674
„	„	„	„	2,00 „	„	+ 8,00 „	12,856
„	„	„	„	1,00 „	„	+ 9,00 „	12,972
„	„	„	„	„	„	+ 10,00 „	13,066



## 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 „ „	ca. 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 „ „	7,621		
5,00 „ „ + 5,00 „ „	ca. 6,548		
4,75 „ „ + 5,25 „ „	ca. 2,371		

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

Zusammensetzung	$p_h$	Indikator
46,70 cm <sup>3</sup> HCl + 50 cm <sup>3</sup> Biphtalat 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	Methyl- orange Brom- phenolblau
14,70 „ „ + 50 „ „ „ „ 100 „ „ .	3,2	
9,90 „ „ + 50 „ „ „ „ 100 „ „ .	3,4	
5,97 „ „ + 50 „ „ „ „ 100 „ „ .	3,6	
2,63 „ „ + 50 „ „ „ „ 100 „ „ .	3,8	

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

Zusammensetzung	$p_h$	Indikator
0,40 cm <sup>3</sup> NaOH + 50 cm <sup>3</sup> Biphtalat bis 100 cm <sup>3</sup>	4,0	Methyl- org., Brphbl.
3,70 „ „ + 50 „ „ „ „ 100 „ „	4,2	
7,50 „ „ + 50 „ „ „ „ 100 „ „	4,4	Methylrot Bromkresol- purpur
12,15 „ „ + 50 „ „ „ „ 100 „ „	4,6	
17,70 „ „ + 50 „ „ „ „ 100 „ „	4,8	
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	

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

<sup>1)</sup> Nach Kolthoff: Der Gebrauch von Farbenindikatoren. 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 Kristallisation gewonnen. Die abgenutzten Mengen werden wenigstens zweimal aus heißem Wasser umkrystallisiert, bei  $110^{\circ}$ — $115^{\circ}$  getrocknet: Die Kristallisation darf nicht unter  $20^{\circ}$  stattfinden, weil dann ein saueres Salz auskrystallisiert.

Sehr gut brauchbare Puffergemische in einem für physiologische Arbeiten besonders wichtigen  $p_h$ -Bereich von 6,8—9,6 sind nach dem Vorschlag von Michaelis mit Veronal (Diäthylbarbitursäure Mol. Gew. 184,11) herzustellen<sup>1)</sup>. Sie können vor allem als ein Ersatz für den Boratpuffer dienen, der infolge der Neigung der Borsäure zur Bildung von Komplexen (z. B. mit Zuckern) oft unbrauchbar ist.

Man löst 10,30 g diäthylbarbitursäures Natrium auf  $500 \text{ cm}^3$  mit  $\text{CO}_2$ -freiem Wasser.  $10 \text{ cm}^3$  dieser Lösung mit 0,1 n-HCl titriert, müssen genau  $10 \text{ cm}^3$  Säure verbrauchen (Indikator Methylrot). Sonst muß für die in der Tabelle angegebenen Zahl Kubikzentimeter Veronallösung eine entsprechende Korrektur angebracht werden.

Folgende Mischungen mit 0,1 n-HCl geben die in der Tabelle angegebenen  $p_h$ -Werte:

Tabelle.

Wenn  $n \text{ cm}^3$  0,1 m-Veronalnatrium mit  $10 - n \text{ cm}^3$  0,1 n-HCl vermischt werden, erhält man die folgenden  $p_h$ -Werte:

$n$	$p_h$	$n$	$p_h$	$n$	$p_h$
(5,10)	(6,40)	6,15	7,60	9,08	8,80
(5,14)	(6,60)	6,62	7,80	9,36	9,00
5,22	6,80	7,16	8,00	9,52	9,20
5,36	7,00	7,69	8,20	9,74	9,40
5,54	7,20	8,23	8,40	9,85	9,60
5,81	7,40	8,71	8,60	(9,93)	(9,80)

Die Zahlen in Klammern sind nicht genau reproduzierbar.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 87, S. 33. 1930. Ob der Puffer die Fermentwirkung schädigt, muß in jedem Falle untersucht werden. Das gilt auch bei Anwendung von Indikatoren. So konnten Bamann und Schmeller (Z. physiol. Chemie Bd. 194, S. 1. 1931) zeigen, daß Bromthymolblau auf die Geschwindigkeit der Methylbutyratspaltung durch verschiedene Esterasen von Einfluß ist.

Wenn man eine Stammlösung von Natriumazetat + Natriumveronal mit steigenden Mengen HCl versetzt, so kann man einen  $p_h$ -Bereich von 2 bis mindestens 9 umspannen<sup>1)</sup>, also das ganze Bereich, das bei Fermentstudien in der Regel von Interesse ist, ohne daß man gezwungen ist, mit dem  $p_h$  gleichzeitig die Art der puffernden Grundsubstanzen sprunghaft zu ändern oder die Ionenstärke zu variieren, oder irgendein zweiwertiges Ion in dem Puffer zu verwenden.

Dieses Prinzip kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden. Es soll hier eine Vorschrift gegeben werden, bei der die „Ionenstärke“ („ionale Konzentration“ nach Bjerrum) durch passenden Zusatz von NaCl stets gleich einer für Blut isotonischen Salzlösung gehalten wird. Die Stammlösung ist eine Lösung,  $\frac{1}{7}$  mol, sowohl in bezug auf Natriumazetat wie auf Veronal-Natrium: 9,714 g Natriumazetat (mit 3 Mol. Kristallwasser) und 14,714 g Veronal-Natrium werden in CO<sub>2</sub>-freiem Wasser zu einem Volumen von 500 cm<sup>3</sup> gelöst. Von dieser Stammlösung werden je 5 cm<sup>3</sup> mit 2 cm<sup>3</sup> 8,5proz. NaCl-Lösung, mit  $a$  cm<sup>3</sup> n/10 HCl und  $(18 - a)$  cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O versetzt. Die nebenstehende Tabelle gibt die Beziehung von  $a$  und  $p_h$  auf Grund elektrometrischer Bestimmung mit der H<sub>2</sub>-Elektrode bei 25,0°.

Durch Anwendung eines weiteren Überschusses an HCl kann man in das Wirkungsoptimum des Pepsins

und darüber hinaus gelangen. Dann wird der  $p_h$  nur noch durch die überschüssige Salzsäure bestimmt.

$a$	$p_h$	$a$	$p_h$
(0	9,64)	7	6,12
0,25	9,16	8	5,32
0,5	8,90	9	4,93
0,75	8,68	10	4,66
1,0	8,55	11	4,33
2,0	8,18	12	4,13
3,0	7,90	13	3,88
4,0	7,66	14	3,62
5,0	7,42	15	3,20
5,5	7,25	16	2,62
6,0	6,99		
6,5	6,75		

### Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration physiologischer Flüssigkeiten mittels Indikatoren.

Die Indikatorenmethode zur Bestimmung der [H<sup>+</sup>] einer Flüssigkeit beruht darauf, daß die Indikatoren ihre Farbnuance bei einer ganz bestimmten Wasserstoffionenkonzentration (bzw. in einem bestimmten engen Gebiet der Wasserstoffionenkonzentrationen) der Lösung ändern. Man kann daher aus der Farbe

<sup>1)</sup> Michaelis: Biochem. Zeitschr. Bd. 234, S. 139. 1931.

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

Indikator	Intervall in $p_h$	Indikator Menge in 10 cm <sup>3</sup>	Säure Färbung	Alkali	Bemerkungen
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	unscharf
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>	„	orange	„
Lackmoid	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	„
Alizarin gelb	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.

auf die  $[H^+]$  der Lösung schließen. Haben zwei Lösungen dieselbe Farbe, so haben sie auch dieselbe Wasserstoffionenkonzentration. Man versetzt daher eine Reihe von Standardlösungen von bekannter  $H^+$ -Ionenkonzentration mit einem geeigneten Indikator, die zu messende Flüssigkeit mit demselben Indikator 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.

Indikatoren von Clark und Lubs.

	$p_H$ -Gebiet	Farbenumschlag	Konzentration der alkoh. Lösung
Thymolblau . . . . .	1,2—2,8	rot-gelb	0,04%
Bromphenolblau . . . . .	3,0—4,6	gelb-blau	0,04%
Methylrot . . . . .	4,4—6,0	rot-gelb	0,02%
Bromkresolrot . . . . .	5,2—6,8	gelb-purpur	0,02%
Bromthymolblau . . . . .	6,0—7,6	gelb-blau	0,04%
Phenolrot . . . . .	6,8—8,4	gelb-rot	0,02%
Kresolrot . . . . .	7,2—8,8	gelb-rot	0,02%
Thymolblau . . . . .	8,0—9,6	gelb-blau	0,04%
Kresolphthalein . . . . .	8,2—9,8	farblos-rot	0,02%

Bei dieser Methode braucht man also Vergleichslösungen von bekannter  $[H^+]$ , wozu sich die Pufferlösungen am besten eignen.

Bei einer von L. Michaelis angegebenen Indikatorenmethode braucht man die Vergleichslösungen mit bekannter  $[H^+]$  nicht. Sie beruht auf dem Prinzip, daß (bei einfarbigen Indikatoren) der Dissoziationsgrad und damit der Farbgrad des Indikators von der  $H^+$ -Konzentration der Lösung abhängt<sup>1)</sup>.

Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration mit Indikatoren 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%ige wässrige Lösung. 4. *m*-Nitrophenol 0,3%ige wässrige Lösung. 5. Phenolphthalein, 0,04 g in 30 cm<sup>3</sup> Alkohol + 70 cm<sup>3</sup> Wasser. 6. *m*-Nitrobenzolzazosalizylsäure („Alizarin gelb GG“), 0,05 g in 50 cm<sup>3</sup> Alkohol + 50 cm<sup>3</sup> Wasser. B. Einige Reagensgläser von gleichem Durchmesser. C. Eine durch

<sup>1)</sup> Vgl. Michaelis u. Gyemant: Biochem. Zeitschr. Bd. 109, S. 165. 1920.

Verdünnung von n-NaOH frisch bereitete Lauge von ungefähr 0,01 n-NaOH-Gehalt. (Bei Verwendung des Indikators Nr. 6 statt dessen von etwa 0,1 n-NaOH-Gehalt.) Ausführung der Bestimmung. In ein Reagensglas (Nr. I) werden 10 cm<sup>3</sup> der zu untersuchenden Lösung gebracht, dazu eine abgemessene Menge eines der obigen Indikatoren, zwischen 0,25 und 1,0 cm<sup>3</sup>; es soll eine ganz schwache Färbung entstehen. Derjenige der obigen Indikatoren 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 Indikators hinzugefügt, bis diejenige Indikatormenge gefunden ist, die die gleiche Farbtiefe in der Lauge erzeugt, wie sie in dem Reagensglas Nr. I herrscht. Indikator Mengen unter 0,25 cm<sup>3</sup> werden aus 10fach verdünnter Indikatorlösung 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 Indikator enthält, deutlich zu dunkel, und ein drittes mit etwa 15% weniger Indikator deutlich zu hell erscheint. So wird (eventuell durch Interpolation) die In-

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	—	—



dikatormenge  $x$  ermittelt, die die Lauge ebenso stark färbt, wie die im Röhrchen I angewendete Indikatormenge  $\alpha$ . Es ist  $\alpha = \frac{x}{a}$ , dann ist für Indikator 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.

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

$\alpha$	$p_h$	$\alpha$	$p_h$	$\alpha$	$p_h$
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	10,2
0,16	9,10	0,50	9,70	0,80	10,3

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

$\alpha$	$p_h$	$\alpha$	$p_h$	$\alpha$	$p_h$
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 Indikatoren ( $p_h$ ):  $\beta$ -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.

## Elektrometrische Messung der Wasserstoffionenkonzentration.

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-Wasserstoffelektrode läßt sich die unbekannte  $[H^{\cdot}]$  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  $H^{\cdot}$ -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 unbekanntenen Lösung,  $c_0$  die der Normalwasserstoffelektrode ist.  $c_0$  ist  $= 1$ ,

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

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

Soll also die Wasserstoffionenkonzentration  $c$  einer unbekanntenen 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:

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

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

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  $\left(\frac{n}{10}$  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  $H^{\cdot}$  gegenüber einer gesättigten Kalomelektrode  $a$  Millivolt, so beträgt er gegenüber der  $n$ -Wasserstoffelektrode  $a$

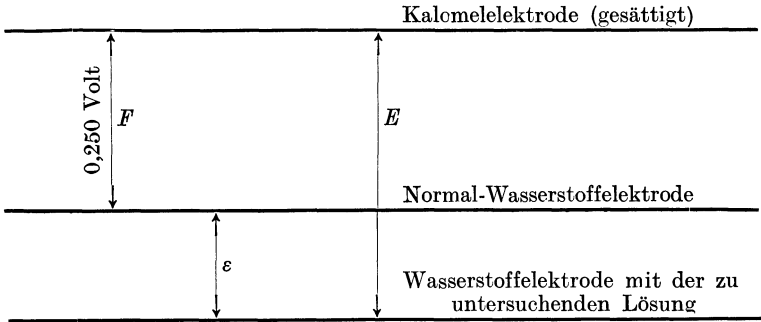
— 250,3 Millivolt (bei 18°). (Vgl. Schema auf S. 74.) Bei den verschiedenen Temperaturen ist die Potentialdifferenz zwischen der n-Wasserstoffelektrode und den Bezugselektroden ebenfalls verschieden. Wie oben angegeben, ist  $p_h = \frac{E}{0,0001983 T}$ . Das Produkt  $T \cdot 0,0001983$ , multipliziert mit 1000 zur Umrechnung von Volt in Millivolt, ist  $\vartheta$ ;  $p_h$  ist somit  $= \frac{E}{\vartheta}$ . Mißt man gegen eine Kalomelektrode die Potentialdifferenz  $E$ , 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	für 28° . . . . .	59,7
„ 16° . . . . .	57,3	„ 29° . . . . .	59,9
„ 17° . . . . .	57,5	„ 30° . . . . .	60,07
„ 18° . . . . .	57,7	„ 31° . . . . .	60,27
„ 19° . . . . .	57,9	„ 32° . . . . .	60,47
„ 20° . . . . .	58,1	„ 33° . . . . .	60,66
„ 21° . . . . .	58,3	„ 34° . . . . .	60,86
„ 22° . . . . .	58,5	„ 35° . . . . .	61,06
„ 23° . . . . .	58,7	„ 36° . . . . .	61,25
„ 24° . . . . .	58,9	„ 37° . . . . .	61,45
„ 25° . . . . .	59,1	„ 38° . . . . .	61,64
„ 26° . . . . .	59,3	„ 39° . . . . .	61,85
„ 27° . . . . .	59,5	„ 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	

Folgendes Schema illustriert die Verhältnisse:



### 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 Methode zur Messung von Potentialdifferenzen bedient sich des Poggendorfschen Prinzips der Kompensationschaltung. Legt man eine Hilfsspannung, die von einer beliebigen Stromquelle,

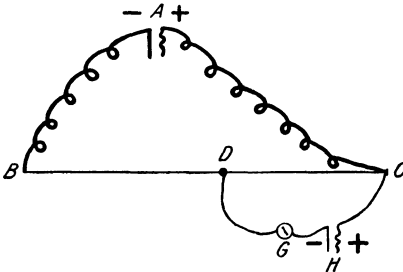


Abb. 39.

z. B. einem Akkumulator herrührt, an die beiden Enden eines Meßdrahtes an, so erhält man einen Stromkreis, den sog. „großen Stromkreis“ (Abb. 39). Legt man die zu untersuchende Spannung mit einem Pol an das eine Ende des Meßdrahtes, mit dem anderen Pol an einen verschiebbaren Kon-

takt, 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 Spannungen einander entgegengesetzt 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 unbekannt 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 unbekannt 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 unbekannt 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 Normalelementes (Kadmiumnormalelement) mit einer Potentialdifferenz von 1018,6 Millivolt (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 diene bis jetzt meist ein sogenanntes Kapillarelektrometer. Ein Quecksilberfaden, dessen Meniskus 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. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß, da jetzt genügend empfindliche Galvanometer leicht erhältlich sind, kein Grund mehr vorliegt, das Kapillarelektrometer (das eher ein stromanzeigendes als ein spannungsanzeigendes Instrument ist) als Nullinstrument zu verwenden. Für die meisten Zwecke ist schon ein Zeigergalvanometer mit einer Empfindlichkeit von  $10^{-7}$  Ampere pro Skalenstrich genügend.

Beschreibung der Messung einer Potentialdifferenz in der Michaelisschen Anordnung (Abb. 40): Man stellt die beiden gleichen 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

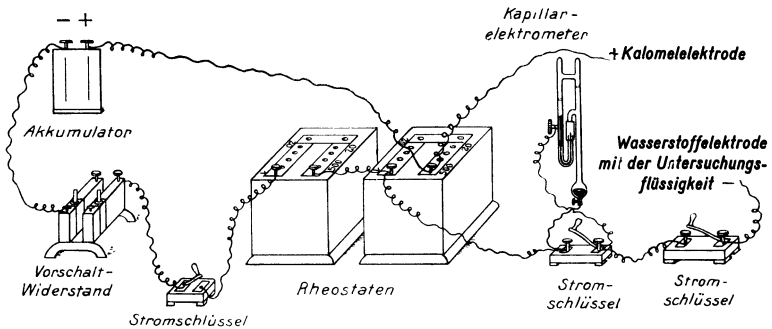


Abb. 40.

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 Kapillarelektrometerstativs, von der anderen Klemme des Kapillarelektrometerstativs zur linken Klemme des rechten Rheostaten. Sind diese Verbindungen sämtlich hergestellt und auf ihre Kontaktsicherheit geprüft, so verbindet man die beiden Pole des Kapillarelektrometers durch dünne spiralige Drähte mit den Polen

seines Stativs und stellt den Meniskus 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 Kapillarelektrometers erkennt man daran, daß es Ausschläge zeigt, ohne daß man Strom hindurchschickt. In diesem Falle muß ein neuer Meniskus hergestellt werden<sup>1)</sup>. Die hauptsächlichsten Isolierungsfehler vermeidet man dadurch, daß man das Kapillarelektrometerstativ, 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 so viel 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 Kapillarelektrometer 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 Meniskus 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 Kapillarelektrometer 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 Kapillarelektrometer 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 anderer-

<sup>1)</sup> Herstellung des Meniskus: 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 so viel Quecksilber wieder durch die Kapillare in den kugeligen Teil zurücktropft, daß der Meniskus sich beim Aufrichten des Elektrometers ungefähr in die Mitte der Kapillare einstellt.



seits 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 Kapillarelektrometers 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 Kapillarelektrometer daher Spannungsmengen unter 1 Millivolt durch Berücksichtigung der Ausschläge des Hg-Fadens innerhalb der Skala abschätzen. Nunmehr ist der Apparat zur Messung der unbekannt Kette gebrauchsfertig und an Stelle des Normalelements wird die unbekannt Kette in den Teilstromkreis eingeschaltet. Die Anordnung der Pole bei der unbekannt 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 Kapillarelektrometers beim Schließen des Teilstromschlüssels und ganz kurzen Öffnen des Stativschlüssels. Sieht man den Ausschlag nach unten gehen, so ist die unbekannt Kette richtig geschaltet, geht er nach oben, so müssen die Pole umgeschaltet werden. Es wird noch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß der Schlüssel am Kapillarelektrometerstativ nur zu der Messung kurz geöffnet wird, sonst immer geschlossen bleiben muß.

### Messung mit dem Potentiometer.

In den letzten Jahren werden an Stelle der Meßdrähte und der Rheostatenkästen zur H-Ionenmessung Apparaturen benutzt, die das Meßverfahren sehr einfach gestalten. Diese Apparate führen den Namen Potentiometer. Meßdrähte, Widerstände, Spulen, Schalter, Drahtwindungen liegen in einem Kasten eingebaut, der außen nur wenige Drehknöpfe und Steckkontakte aufweist. Als Nullinstrument wird ein empfindliches Galvanometer benutzt.

Die Leitungsanordnung des Potentiometers von E. Mislowitzer geht aus der Abbildung hervor.

Die Spannung der Batterie  $B$  fällt über einem Meßdraht und einem Kurbelrheostaten ab, die hintereinander geschaltet sind. In demselben Stromkreis liegt noch der Regulierwiderstand  $RW$ . Mit Hilfe dieses Regulierwiderstandes ist es möglich, den Gesamtspannungsabfall über Meßdraht + Kurbelrheostat in bestimmten Grenzen zu verändern. Der zirkulär angeordnete Meßdraht ist

von 0—100 unterteilt. Jeder einzelne der 10 Widerstände des Kurbelrheostaten ist ebenso groß wie der Widerstand des ganzen Meßdrahtes. Dadurch ist der Gesamtwiderstand in 11 große und unter Zuhilfenahme der 100 kleinen Teile des Meßdrahtes in 1100 kleine Teile unterteilt. Wird nun an die Enden dieses Gesamtwiderstandes eine Spannung von genau 1100 Millivolt angelegt, so fällt über jedem kleinen Teil gerade ein Millivolt ab. Zur Kontrolle darüber, daß über Meßdraht + Kurbelrheostat genau 1100 Millivolt abfallen, wird an die Enden des Gesamtwiderstandes ein Präzisionsvoltmeter angelegt. Dieses Voltmeter ist auf den einen Punkt, 1100 Millivolt, geeicht. Es ist ebenso wie bei der Rheostatenapparatur mit Vorschaltwiderstand einerlei, wie groß die genaue Klemmenspannung des Akkumulators  $B$  ist. Alles, was von der Spannung des Akkumulators über 1100 Millivolt hinausgeht, wird vom Regulierwiderstand  $RW$  unterdrückt.

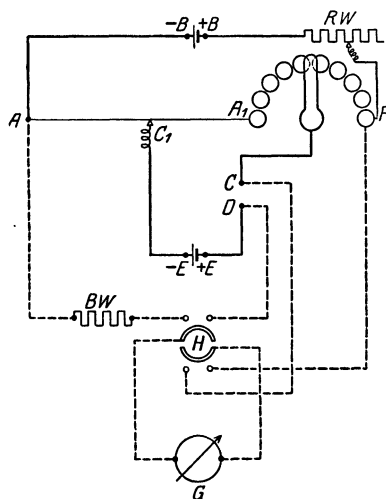


Abb. 41. Leitungsschema.

$B$  Akkumulator,  $RW$  Regulierwiderstand,  $A-A_1$  Meßdraht,  $A_1-F$  Drehrheostat,  $C_1$  Gleitkontakt,  $E$  unbekannte Spannung,  $BW$  Ballastwiderstand,  $H$  Umschalter,  $G$  Galvanometer.

Bei der Messung werden der Kurbelrheostat und der Kontakt  $C_1$  auf dem Meßdraht so lange verstellt, bis das Galvanometer im Teilstromkreis Stromlosigkeit anzeigt. Ist der Punkt erreicht, so fällt zwischen der Kurbel und dem Punkt  $C_1$  eine Spannung ab, deren Größe für den großen Stromkreis und den Teilstromkreis dieselbe ist. Da in dem großen Stromkreis über jedem einzelnen Widerstandsschritt gerade ein Millivolt abfällt, so läßt sich aus der Zahl der zwischen  $C_1$  und der Kurbel liegenden Widerstandsschritte die zwischen  $C_1$  und der Kurbel liegende Spannung direkt in Millivolt ablesen. Diese Spannung ist nach erfolgter Kompensation gleich der unbekanntnen Spannung  $E_x$ .

Die Regulierung der vom Akkumulator stammenden Hilfsspannung auf genau 1100 Millivolt und das Auffinden der Kompensationsstelle bei der eigentlichen Messung wird mit einem Meßinstrument durchgeführt. Zum Einregulieren der Teilspannung des Akkumulators auf 1100 Millivolt wird das Meßinstrument an

die Enden des Meßdrahtes und des Kurbelrheostaten ( $A—F$ ) angelegt. Bei dieser Schaltung liegt ein Ballastwiderstand von fast  $100000\Omega$  vor dem Meßinstrument, das durch den hohen Widerstand als Voltmeter wirkt. Durch Betätigen eines Umschalters (in der Abbildung mit  $H$  bezeichnet) wird das Instrument von den Enden der Brückenwiderstände abgeschaltet und zugleich ohne Ballastwiderstand in den Teilstromkreis (bei  $C$  und  $D$ ) gelegt. Hier dient es mit einer Empfindlichkeit von ca.  $10^{-7}$  Ampere für jeden Teilstrich als gewöhnliches Nullinstrument.

Ausführung der Messung. Zum Aufbau der Apparatur wird der Kompensationskasten auf den Tisch gestellt, das Meßinstrument links daneben. Durch Verstellen der 3 Stellschrauben, auf denen das Meßinstrument steht, wird es sorgfältig horizontal gestellt. Die Meßinstrumentlibelle zeigt die Horizontalstellung an. Dann wird der Deckel des Kompensationskastens aufgeklappt, der 2-Volt-Akkumulator durch Leitungsschnüre mit den Steckkontakten bei  $V$  und das Galvanometer mit den Steckkontakten bei  $G$  verbunden, beide Male unter Berücksichtigung der Polbezeichnung. Jetzt entarretiere man das Meßinstrument, indem man den Arretierhebel nach Entfernung des Sicherheitsstiftes von rechts nach links umlegt, und überzeuge sich davon, ob der Zeiger genau auf Null steht oder genau um die Nullage schwingt. Steht der Zeiger einen halben oder einen Teilstrich vor oder hinter Null, so berücksichtige man diese Differenz bei der folgenden Einstellung auf den 1100-Punkt. Ist die Differenz aber größer als ein Teilstrich, so korrigiere man sie durch Verstellen der Nullpunktschraube. Zu diesem Zwecke nehme man den Glasdeckel von der Glasröhre ab, in der der Zeiger aufgehängt ist, und drehe vorsichtig mit einem Finger an der unter dem Deckel befindlichen Hartgummischraube so lange, bis der Zeiger genau über Null steht. Der bis dahin auf  $M$  (Messen) zeigende Umschalter (vgl. Abb.) wird auf  $P$  (Prüfen) gestellt und der rote Knopf am Regulierwiderstand  $RW$  so lange gedreht, bis der Zeiger über der roten Marke bei dem 1100-Punkt steht. Stand der Zeiger bei der Nullstellung ohne jede Abweichung über dem Nullstrich, so wird er auch jetzt ganz genau auf den 1100-Strich eingestellt. Andernfalls berücksichtige man jetzt eine kleine Abweichung der Nullpunktslage nach rechts oder links, indem man den Zeiger um denselben Betrag nach rechts oder links von dem 1100-Punkt einreguliert. Ist das geschehen, so stelle man den Umschalter von  $P$  auf  $M$  zurück. Nunmehr kann die eigentliche Messung beginnen.

Das war die Einstellung der Apparatur ohne Benutzung eines Normalelementes. Voraussetzung für diese Art Einstellung ist, daß

das Voltmeter in gutem Zustande ist. Will man sich auf die Genauigkeit des Voltmeters nicht verlassen, so nehme man die Einstellung der Apparatur mit Normalelement vor. Für diesen Fall bleibt der Umschalter stets auf *M*. Die *P*-Stellung, bei der das Instrument als Voltmeter wirkt, ist dann überflüssig.

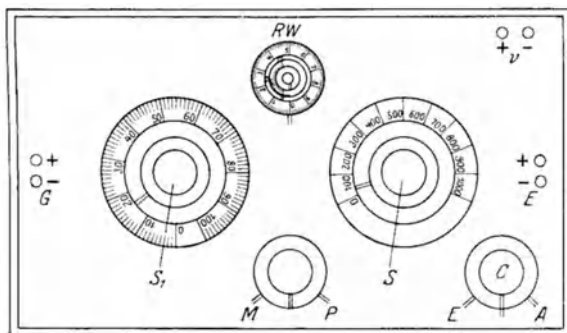


Abb. 42.

Um mit einem Normalelement einzustellen, schalte man zunächst dieses Element an die Steckkontakte von *E* an und stelle die Brücke auf diejenige Millivoltzahl, die das Normalelement gerade aufweist. Hat es z. B. eine Spannung von 1018 Millivolt, so stelle man den rechten Drehrheostaten auf 1000 und den linken auf 18. Die Brückenstellung ist dann also 1018. Nun schalte man den Einschalter *C* von *A* vorsichtig nach *E* und beobachte dabei den Zeigerausschlag. Gibt der Zeiger schon bei der Zwischenstellung zwischen *A* und *E* einen Ausschlag, so schalte man gar nicht erst ganz bis *E*, um starke Ausschläge des Zeigers zu vermeiden. Gibt der Zeiger aber auf der Zwischenstellung des Einschalters nur einen schwachen oder gar keinen Ausschlag, dann schalte man den Einschalter völlig bis *E* ein. Durch abwechselndes Ein- und Ausschalten und Regulieren des Vorschaltwiderstandes suche man die Stelle, auf der der Zeiger auch bei schnellem Einschalten von *A* nach *E* weder nach rechts noch nach links ausschlägt. Hat man diesen Punkt gefunden, so ist die Einstellung des Apparates beendet, da jetzt über jedem Brückenschritt genau 1 Millivolt abfällt.

Zur Messung der unbekanntenen Potentialdifferenz nach vollzogener Einstellung der Apparatur wird die Elektrodenkette an die Steckkontakte bei *E* angelegt. Beide Drehrheostaten werden auf Null gestellt. Jetzt wird vorsichtig von *A* nach *E* geschaltet

(meistens genügt die Mittelstellung) und der Ausschlag des Zeigers beachtet. Geht der Ausschlag nach rechts, so ist falsch gepolt, und die Elektrodenkette muß umgekehrt geschaltet werden (durch einfaches Umstecken der Strecker von  $E$ ).

Geht der Zeigerausschlag nach links, so wird der rechte Drehrheostat auf 100 gestellt und der Einschalter gleich wieder von  $A$  nach  $E$  geschaltet; geht der Zeiger jetzt ebenfalls noch nach links, so wird der Drehrheostat auf 200 gestellt, dann auf 300, 400, 500 usw., bis der Zeiger nach rechts ausschlägt. Ist das z. B. bei 500 der Fall, so stelle man den rechten Rheostaten auf 400 zurück und suche nun mit dem linken Drehrheostaten die wirkliche Kompensationsstellung. Mit dem linken Drehrheostaten stelle man z. B. auf 20, 40, 60 usw. Schlägt der Zeiger bei 40 nach links, bei 60 nach rechts, so stelle man zuerst auf 45, dann auf 55, gabele also die Nullstellung ein. Sehr bald ist dann die wirkliche Ruhelage gefunden. Steht der linke Drehrheostat auf 48, wenn der Zeiger beim Ein- und Ausschalten keinen Ausschlag mehr gibt, so beträgt die gemessene Spannung  $400 + 48$ , also 448 Millivolt. Bei nicht zu großem Widerstand in der Kette läßt sich noch weit genauer als auf 1 Millivolt einstellen. Die neuen im Handel befindlichen Instrumente ermöglichen die Ablesung von 0,5 und 0,25 Millivolt.

Es sei nochmals betont, daß der Fehler des Voltmeters dadurch festgestellt wird, daß die Apparatur zunächst mit Hilfe des Normalelementes nach guter Nullpunktskorrektur eingestellt und der Umschalter hinterher von  $M$  auf  $P$  gestellt wird. Jetzt schlägt der Zeiger aus. Stellt er sich genau auf den 1100-Strich, so ist das Voltmeter fehlerfrei, im anderen Falle nicht fehlerfrei.

Die Größe dieses Fehlers läßt sich direkt in Millivolt messen. Man stelle mit Hilfe der Voltmetereinstellung, also ohne Benutzung eines Normalelementes, nach guter Nullpunktskorrektur den Zeiger unter Benutzung einer Lupe genau auf den 1100-Strich, schalte dann von  $P$  auf  $M$  zurück und messe nun die Spannung eines Normalelementes, das man bei  $E$  anlegt, indem man die Kompensationsstellung sucht.

Mißt man z. B. jetzt statt 1018 Millivolt 1028 Millivolt, so macht man bei allen Messungen pro 100 Millivolt einen Fehler von 1 Millivolt. Der Fehler rührt daher, daß man den Zeiger auf 1100 eingestellt hat, obwohl das etwas nachgealterte Meßinstrument erst bei einer Spannung von 1111 Millivolt bis zu dem Strich 1100-Strich ausschlägt. Stellen wir bei diesem Beispiel die Apparaturen mit Hilfe eines Normalelementes ein und schalten dann von  $M$  auf  $P$ , so wird der Zeiger nicht auf 1100 gehen, sondern ca. 1,5

Teilstriche davor haltmachen; an diesem Punkte sollte eigentlich die Marke 1100 sein. Wollte man mit diesem veränderten Instrument ohne Normalelement weiterhin fehlerfrei arbeiten, so dürfte man in Zukunft den Zeiger nicht mehr auf die Marke 1100 einstellen, sondern 1,5 Teilstriche davor. Auf diese Weise läßt sich also der Fehler eliminieren.

### 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  $H^+$  1 n-Lösung eintaucht. Als Bezugs elektroden dienen am häufigsten 0,1-n-Kalomelektroden oder gesättigte Kalomelektroden. Die Kalomelektroden stellt man sich selbst her. Man benutzt entweder gewöhnliche Flaschen von ca. 100 cm<sup>3</sup> Inhalt oder die käuflichen Elektrodengefäße.

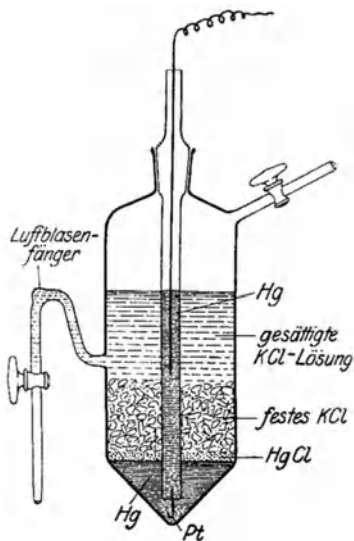


Abb. 43.

Herstellung einer 0,1-n-Kalomelektrode<sup>1)</sup>: Der Boden des Gefäßes (am besten die Form, wie sie Abb. 43 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 gegossen, das Wasser abgegossen und der Rest des Wassers mit Filtrierpapier entfernt.

<sup>1)</sup> Vgl. Michaelis-Rona: Praktikum, S. 178. 4. Aufl. 1930.

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<sup>1)</sup>. 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-Kalomelelektrode beschrieben ist. Nur nimmt man als Lösung gesättigte KCl-Lösung und schichtet zum Schluß noch festes, gepulvertes KCl in dichter Schicht über das Kalomel. Dies gelingt sehr leicht, indem man eine bei etwa 40° gesättigte KCl-Lösung einsaugt. Nach dem Abkühlen kristallisiert innen das KCl aus. 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 elektrolitische 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 pla-

---

<sup>1)</sup> Am sichersten verwendet man Kalomel, das elektrolytisch durch anodische Polarisation von reinem Hg in HCl bereitet worden ist. Es ist durch Beimengung von Hg grau gefärbt. Es wird feucht aufbewahrt und vor Benutzung mit derjenigen Lösung wiederholt gewaschen, mit der es später in dauerndem Kontakt sein soll (Michaelis).

tiniert. In ein kleines Gefäßchen füllt man einige  $\text{cm}^3$  einer Lösung von 1 g Platinchlorid + 0,007 g Bleiazetat in 30  $\text{cm}^3$  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  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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<sup>1)</sup>.

**Birnenelektrode:** Zum Gebrauch wird das destillierte Wasser aus der Elektrode entleert und die Untersuchungsflüssigkeit eingefüllt. Nun wird durch die Elektrode Wasserstoff durchgeleitet. Den Wasserstoff entwickelt man in einem Kippschen Apparat (aus As-freiem Zink und verdünnter Schwefelsäure mit etwas  $\text{CuSO}_4$ ) und leitet ihn durch eine Waschflasche mit 2 proz. Lösung von Kaliumpermanganat und durch eine, die mit konzentrierter Sublimatlösung beschickt ist<sup>2)</sup>. An der Elektrode ist Hahn I ge-

<sup>1)</sup> Sollte es vorkommen, daß verschiedene Elektroden etwas größere Abweichungen haben — bei alten Platinierungen oder manchmal aus unbekanntem Gründen, so kann man sich durch folgenden Kunstgriff helfen (Michaelis): Bijlman fand, daß sogar eine blanke Platinelektrode sich wie eine reversible Wasserstoffelektrode verhält, wenn man der zu messenden Lösung ein wenig kolloidales Palladium zusetzt. Die Einstellung des Potentials erfordert allerdings längere Zeit. Denselben Kunstgriff kann man nach Michaelis aber mit noch größerem Erfolg bei platinieren Platinelektroden anwenden, wenn sie irgendwie unsicher sind. Von „kolloidalem Palladium nach Nacht-Pal“, 1 : 1000, in Wasser gelöst (dauernd haltbar), werden einige Tropfen der zu messenden Lösung zugesetzt. In wenigen Minuten findet man innerhalb  $\frac{1}{10}$  Millivolt Übereinstimmung bei allen, auch den sonst sich etwas abnorm verhaltenden platinieren Platinelektroden.

Besonderes Schütteln der Elektrode ist nicht erforderlich. Die Gasdurchleitung sorgt für genügende Durchmischung. Das endgültig eingestellte Potential muß unverändert bleiben, ob man während der Ablesung das Gas (langsam) weiterströmen läßt oder nicht.

<sup>2)</sup> Zur Befreiung von  $\text{O}_2$  kann verwendet werden: alkalische Pyrogallollösung oder frische Natriumhydrosulfidlösung oder, viel sicherer, ein 20 cm langes, mit Platinasbest gefülltes Rohr aus schwer schmelzbarem Glase, das durch Gasheizung oder durch einen elektrischen Heiz-



öffnet, 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  $\square$ 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<sup>1)</sup>.

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

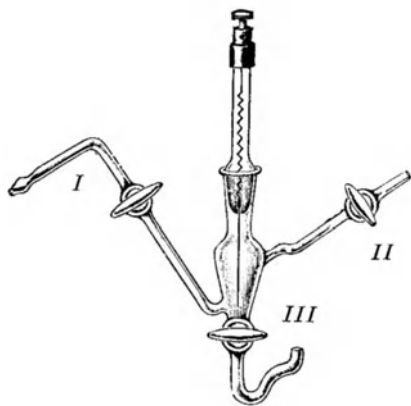


Abb. 44.

Potentialdifferenz unverändert, so ist die Messung beendet. Andernfalls wiederholt man das Einleiten von Wasserstoff. Diese Birnenelektroden kann man für alle Lösungen gebrauchen, bei

draht erhitzt wird. Eine Temperatur von 350° ist mehr als ausreichend, Rotglut (700°) keinesfalls erwünscht oder gar erforderlich. Eine andere Methode ist Leiten über metallisches Kupfer bei 400—500°.

<sup>1)</sup> Neuerdings verwendet Michaelis statt des kapillar zugespitzten Endes des Agarhebers, welche durch Retraktion des Agar leicht eine Luftblase einläßt und dann unbrauchbar wird, folgendes Verfahren. Der Agarheber wird durch ein Glasrohr von überall gleichmäßigem Kaliber, ohne Zuspitzung, gebildet. Während des Einfüllens des Agar wird in das eine Ende ein kurzes Stück Glasstab gesteckt, von solchem Kaliber und Form, daß es einigermäßen fest eingekelt werden kann, und derart, daß 1—2 mm desselben aus der Öffnung herausragt. Der kapillare Spalt zwischen diesem Glaspfropf und dem Glasrohr ist durch KCl-Agar verstopft und stellt eine ausreichende leitende Verbindung von minimaler Diffusionsfläche dar. Solches Rohr kann nach Gebrauch in öfter gewechselter gesättigter KCl-Lösung ausgewaschen und lange Zeit gebrauchsfähig erhalten werden.

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 Azidität 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 Glaskapillare, die man bis an den Scheitel der U-Röhre führt, einige Wasserstoffblasen in den

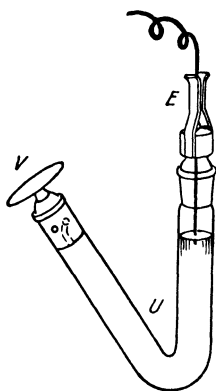


Abb. 45.

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.

**Glockenelektrode.** Die Glockenelektrode wird bei der elektrometrischen Titration angewendet. Dabei wird die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration während der Titration oder auch die Änderung des Potentials gegen eine Wasserstoffelektrode schrittweise verfolgt. Die Form der Glockenelektrode ist aus Abb. 46 ersichtlich.

Ein glockenförmiges Glasgefäß ist nach oben zu einem engeren Glasrohr verlängert, das oben einen Glashahn trägt. Dicht oberhalb der Glocke ist durch die Wand des Glasrohres ein Platindraht eingeschmolzen, der über die untere Öffnung der Glocke ein wenig herüberraagt. Das andere Ende des

Platindrahtes ist von einem angeschmolzenen Glasstutzen umgeben, in den Quecksilber eingefüllt ist oder statt dessen zu einer Klemmschraube führt. Hiermit wird der ableitende Kupferdraht verbunden. Die Elektrode wird wie in Abb. 46 an einem Stativ über einer Porzellanschale derart befestigt, daß der Glockenrand in die zu titrierende Flüssigkeit etwas eintaucht. Über dieser Flüssigkeit ist die Titrierbürette angebracht. Ferner taucht in die Lösung noch ein KCl-Agarheber (siehe S. 87) ein, der an seinem anderen Ende in gesättigter KCl-Lösung steht. In diese taucht außerdem eine gesättigte Kalomelektrode ein.

Der Platindraht wird vor der Benutzung auf folgende Weise vorbereitet. Das etwa  $\frac{1}{2}$  cm überragende Ende des Drahtes wird vorsichtig in einem kleinen Flämmchen schwach geglüht und der ganze Draht dann mit Hilfe einer Pinzette in eine leichte Schraubenwindung gelegt, so daß er eben nur überragt. Dann befestigt man die Elektrode über einer Schale mit Platinierungsflüssigkeit, saugt die Glocke mit dieser voll und platiniert den Platindraht mit Hilfe einer außen befindlichen Hilfs-elektrode aus Platin. Dann wird die Platinlösung ausgewaschen und durch verdünnte Schwefelsäure ersetzt und diese kathodisch polarisiert, zum Schluß gewaschen.

Während der Messung leitet man einen Strom Wasserstoffgas von oben her durch die Glocke in der Sekunde etwa 1—2 Blasen und dreht den Hahn zu. Bei richtiger Länge des Platindrahtes gelingt es leicht, die Gaszuleitung in einem Augenblick zu unterbrechen, wo die Spitze des Platindrahtes gerade nur eben noch eintaucht. Man taucht auch den KCl-Agarheber ein, der eine möglichst feine Spitze besitzen soll und liest das Potential ab. Der positive Pol ist die Kalomelektrode.

**Eichung der Kalomelektrode.** Bei der Herstellung der gesättigten Kalomelektrode 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 Standardazetat gefüllte Wasserstoffelektrode bestimmt. Standardazetat ist eine Lösung von  $50 \text{ cm}^3 \text{ n-NaOH} + 100 \text{ cm}^3 \text{ n-Essigsäure} + 350 \text{ cm}^3 \text{ Wasser}$ , d. h. eine Lösung von 0,1 n-Essig-

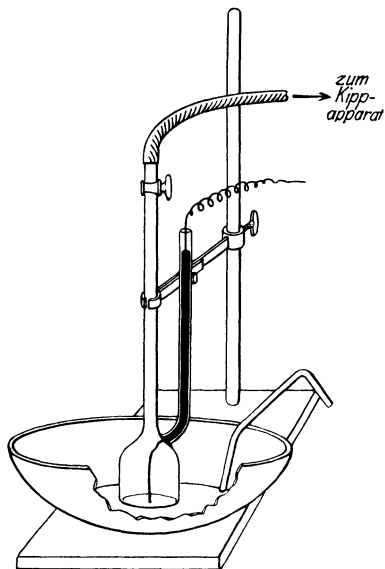


Abb. 46. Elektrometrische Titration mit der Glockenelektrode.

säure + 0,1 n-Natriumazetat. Eine Birnenelektrode, die, wie oben beschrieben, platinirt und vorbehandelt ist, wird mit dem Standardazetatgemisch gefüllt und Wasserstoff durchgeleitet (ebenfalls genau in der oben beschriebenen Anordnung). Man schaltet nun die Kalomelektrode 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 Standardazetates gegen die gesättigte Kalomelektrode 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.

Will man das Potential der gesättigten Kalomelektrode, das experimentell auf die Standardazetat-H<sub>2</sub>-Elektrode bezogen worden ist, auf die Normalwasserstoffelektrode von gleicher Temperatur umrechnen, so ist

$$E_{\text{KalH}} = E_{\text{KalStd.}} - 4,62 \cdot \vartheta,$$

wo  $E_{\text{KalStd.}}$  das Potential der Kalomelektrode gegen die Standardazetat-H<sub>2</sub>-Elektrode, und  $E_{\text{KalH}}$  das Potential der Kalomelektrode gegen die Normalwasserstoffelektrode ist.

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 Kalomelektrode gegen eine Wasserstoffelektrode mit Standardazetat. Man findet das Potential  $E_0$ .

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

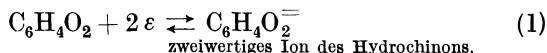
3. Man berechnet die Differenz  $E_x - E_0 = E$  in Millivolt und dividire dies durch  $\vartheta$  (vgl. S. 73). Die auf diese Weise erhaltene Zahl wird zu 4,62 algebraisch addiert (also, wenn sie eine negative Größe war, von 4,62 subtrahiert). Das erhaltene Resultat ist der  $p_h$  der zu messenden 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  $[H^+]$  der Lösung abhängt.

In einem Gemisch von Hydrochinon und Chinon ist der reversible Vorgang an der Elektrode



Aus dieser Gleichung folgt (für 30°)

$$E_h = E_0 + \frac{0,060}{2} \log \frac{[\text{Chinon}]}{[\text{zweiwertige Ionen des Hydrochinons}]} \quad (2)$$

Der Divisor 2 rührt daher, weil nach Gleichung (1) zwei Elektronen an dem Elementarvorgang beteiligt sind.

Ist die Lösung sauer oder nur sehr wenig alkalisch (bis höchstens  $p_h$  7,5) so ist das Hydrochinon fast völlig in undissoziierter Form vorhanden, da es eine sehr schwache Säure ist. In diesem Fall ist (nach dem Massenwirkungsgesetz) die Konzentration der zweiwertigen Hydrochinon-Ionen in guter Annäherung proportional der gesamten Konzentration des Hydrochinons und dem Quadrat der Konzentration der H-Ionen. Aus (2) wird:

$$E_h = E_0 + \frac{0,060}{2} \log \frac{[\text{Chinon}] \cdot [H^+]^2}{k \cdot [\text{Hydrochinon}]}$$

oder

$$E_h = E'_0 + 0,030 \log \frac{[\text{Chinon}]}{[\text{Hydrochinon}]} + 0,060 \log [H^+],$$

wo  $E'_0$  durch Zusammenziehung von  $E_0$  und  $\frac{0,060}{2} \log \frac{1}{k}$  entstanden ist.  $E_h$  hängt also nicht nur von dem Mengenverhältnis Chinon : Hydrochinon, sondern auch vom  $p_h$  ab.

Benutzt man nun Chinhydron (eine kristallisierte Molekularverbindung von 1 Mol Chinon + 1 Mol Hydrochinon, die in Lösung fast völlig in ihre Komponenten zerfällt) ist das Verhältnis Chinon : Hydrochinon = 1 und die letzte Formel vereinfacht sich zu

$$E_h = E'_0 + 0,060 \log [H^+]$$

oder

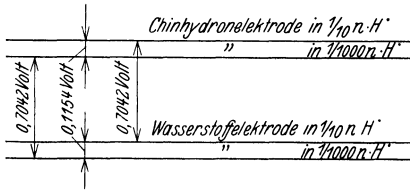
$$E_h = E'_0 - 0,060 p_h.$$

Der Potentialunterschied zweier Chinhydronlösungen von verschiedenem  $p_h$  ist also

$$E = 0,060 (p_{h_1} - p_{h_2}).$$

Ist  $p_{h_1}$  bekannt, so kann  $p_{h_2}$  berechnet werden.

Den Potentialunterschied zwischen einer Chinhydron- und einer Wasserstoffelektrode beträgt nach Bijlmann bei 18° stets



0,7042 Volt. Dieses Verhältnis ist unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration. Dies wird durch das nebenstehende Schema illustriert.

Mißt man den Potentialunterschied gegen die gesättigte Kalomelektrode, so

rechnet man ihn auf die Normal-Wasserstoffelektrode um als Bezugspunkt nach der Gleichung

$$p_h = \frac{0,4538 - \pi \text{ gesättigt}}{0,0577} \quad (\text{bei } 18^\circ),$$

$$\text{genauer: } p_h = \frac{0,4538 - 0,00009 (t - 18) - \pi \text{ ges.}}{0,0577 + 0,0002 (t - 18)}$$

und nach dem Schema:

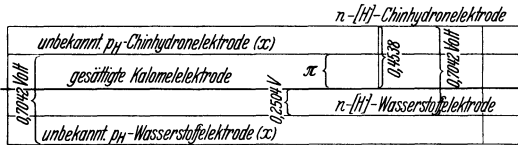


Abb. 48.

Für eine  $1/10$  n-Kalomelektrode lautet die Gleichung:

$$p_h = \frac{0,3662 - \pi_{0,1n}}{0,0577} \quad (\text{bei } 18^\circ),$$

$$\text{genauer: } p_h = \frac{0,3662 - 0,00068 (t - 18) - \pi_{0,1n}}{0,0577 + 0,0002 (t - 18)}$$

(Die Kalomelektrode bildet den negativen Pol der Kette.)

Zur Messung gibt man zu der zu untersuchenden Lösung etwas Chinhydron (Kahlbaum)<sup>1)</sup> ca. 0,1 g, schüttelt ein wenig um und

<sup>1)</sup> Man kristallisiert das käufliche Chinhydron am besten um, indem man es in Wasser bei einer Temperatur von nicht über 60° zur Sättigung löst und das Filtrat im Zimmer zur Kristallisation bringt. Das trockene Präparat ist haltbar.

taucht einen blanken Platindraht oder ein Platinblech in die Lösung. Man benutzt auch vergoldetes Platin als Elektrode. Die Vergoldung erfolgt ähnlich wie die Platinierung. Man löse 1 g Goldchlorid in 50 g Wasser und füge von einer KCN-Lösung so viel zu, daß die Goldfarbe eben unbemerkbar geworden ist. Man vergolde mit 3 oder 4 Volt und regulierbarem Widerstand mit der schwächsten noch wirksamen Stromstärke so weit, bis gerade ein vollständiger Goldüberzug erreicht ist. Es wird ausdrücklich betont, daß bei der Chinhydronelektrode die Elektroden unplatinieren verwandt werden. Eine Mikrochinhydronelektrode hat Ettisch<sup>1)</sup> beschrieben (Abb. 49). Eine vorteilhafte Form ist von Michaelis

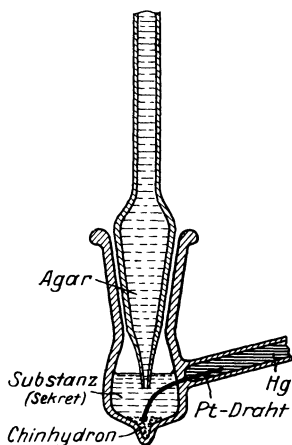


Abb. 49.

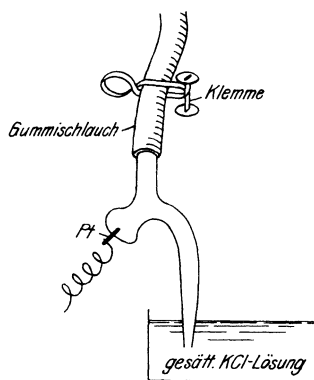


Abb. 50. Mikroform einer Chinhydronelektrode.

angegeben (Abb. 50). Als Bezugs elektrode kann jede bekannte Elektrode dienen, auch eine Chinhydronelektrode, die eine Lösung mit einer genau bekannten  $[H^+]$  enthält, z. B. nach Veibel eine Lösung von 0,01 n-HCl + 0,09 n-KCl. —  $p_h$  dieser Elektrodenflüssigkeit ist = 2,04. Die Elektrodenflüssigkeiten werden, wie üblich, durch elektrolytische Stromschlüssel verbunden<sup>2)</sup>. Auch gibt es

<sup>1)</sup> Ettisch: Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie u. mikr. Technik Bd. 42, S. 302. 1925.

<sup>2)</sup> Herstellung elektrolytischer Stromschlüssel nach E. Müller. „Zwei T-Rohre aus Glas werden am Ende ihrer langen Schenkel mit Fließpapier fest verstopft. Man tränkt ein wenig Filtrierpapier mit der Lösung, mit der das U-Rohr gefüllt werden soll und formt durch Rollen zwischen den Fingern kleine Pfropfen. Nun stellt man die T-Rohre mit dem langen Schenkel fest auf eine ebene Tischplatte, so daß dessen Öffnung dadurch verschlossen wird, und führt von der entgegengesetzten Seite nacheinander

Elektrodengefäße, 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 so weit herabsetzen können, daß der Fehler nicht in Betracht kommt. In allen Fällen erhält man bei einem  $p_h$ , der kleiner als 7,5 ist, gute Resultate<sup>2)</sup>. Man Sorge dafür, daß die Temperatur der Lösung schon vor dem Zusatz des Chinhydrons bis auf einen Bruchteil eines Grades dieselbe ist wie in der Kalomelektrode und beobachte das Potential nach wiederholten Umschütteln 5—10 Minuten lang (womöglich nicht länger). Es ist vorteilhaft, die Luft aus der zu untersuchenden Lösung wenigstens im groben, durch Stickstoff zu verdrängen (Michaelis).

### Messung der H-Ionenkonzentration mit Röhren-Voltmeter<sup>3)</sup>.

Eine prinzipiell neue Methode zur Messung kleiner elektrischer Potentiale, wie sie bei der elektrometrischen  $p_h$ -Bestimmung auftreten, stellt die Anwendung der Elektronenröhre dar. Diese besteht aus einem evakuierten Gefäß (Abb. 51), in das zwei Elektroden, eine Anode und eine Kathode, und eine zwischen den Elektroden liegende Drahtspirale, das sog. „Gitter“, eingeschmolzen sind. Die Kathode kann durch Anlegen einer elektrischen Spannung, die aus der „Heizbatterie“ stammt, zum Glühen erhitzt werden, wobei sie Elektronen aussendet. Legt man an die Elektroden der Röhre eine Spannung an, indem man die Glühkathode mit dem

mehrere Präpfchen 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 Querschenkel mit einem Stückchen Gummischlauch und füllt das so entstandene H-Rohr bis etwas über dieselben mit dem Elektrolyten mit Hilfe eines Kapillartrichters. 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> Mislowitzer: Biochem. Zeitschr. Bd. 159, S. 76.

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

<sup>3)</sup> Vgl. Berl, Herbert und Wahlig: Chemische Fabrik Bd. 3, S. 445, 458. 1930.



negativen Pol, die andere Elektrode mit dem positiven Pol der „Anodenbatterie“ verbindet, so werden die ausgesandten Elektronen von der Anode angezogen und transportieren den elektrischen Strom durch die Röhre. Die Stärke dieses Stromes (Anodenstrom), die durch ein Milliampereometer gemessen werden kann, ist von dem Potential abhängig, das das Gitter gegenüber der Kathode besitzt. Untersucht man bei konstant gehaltener Anodenspannung die Stärke des Anodenstromes bei verschiedenen Gitterspannungen und stellt man diese Beziehung graphisch dar, so erhält man die sog. „Röhrencharakteristik“. Ist das Gitter negativ gegenüber der Kathode, so wird die Geschwindigkeit der Elektronen in der Röhre verringert und die Anodenstromstärke nimmt ab; in dem Maße, wie das Gitter positiver wird, nimmt die Stromstärke des Anodenstromes zu. Die Röhrencharakteristik stellt eine S-förmig gekrümmte Kurve dar (Abb. 52), deren Mittelstück geradlinig verläuft; in diesem Teil der Kurve, der allein für die Meßtechnik in Frage kommt, besteht also eine lineare Beziehung zwischen Gitterspannung und Anodenstromstärke. So gelingt es, kleine Potentialänderungen als Stromstärkeschwankungen zu messen. Diese Anordnung eignet sich besonders für  $p_h$ -Bestimmungen, da zwischen  $p_h$  und EMK der Meßkette ebenfalls eine lineare Beziehung herrscht, so daß also auch die Stromstärke des Anodenstroms geradlinig vom  $p_h$  abhängt; es ist daher möglich, die Skala des Milliampereometers direkt in  $p_h$ -Einheiten zu eichen. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, daß alle Kompensationsvorrichtungen fortfallen und daß aus der Meßkette kein Strom entnommen wird.

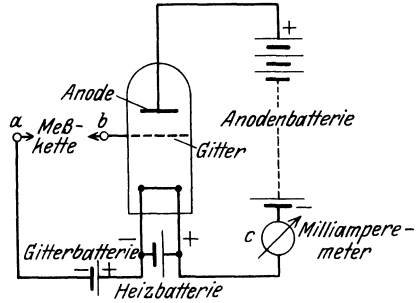


Abb. 51.

Die Röhrencharakteristik stellt eine S-förmig gekrümmte Kurve dar (Abb. 52), deren Mittelstück geradlinig verläuft; in diesem Teil der Kurve, der allein für die Meßtechnik in Frage kommt, besteht also eine lineare Beziehung zwischen Gitterspannung und Anodenstromstärke. So gelingt es, kleine Potentialänderungen als Stromstärkeschwankungen zu messen. Diese Anordnung eignet sich besonders für  $p_h$ -Bestimmungen, da zwischen  $p_h$  und EMK der Meßkette ebenfalls eine lineare Beziehung herrscht, so daß also auch die Stromstärke des Anodenstroms geradlinig vom  $p_h$  abhängt; es ist daher möglich, die Skala des Milliampereometers direkt in  $p_h$ -Einheiten zu eichen. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, daß alle Kompensationsvorrichtungen fortfallen und daß aus der Meßkette kein Strom entnommen wird.

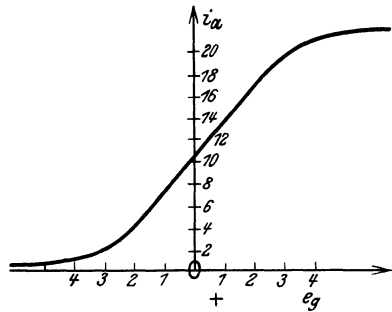


Abb. 52.

Die Empfindlichkeit der Methodik kann dadurch gesteigert werden, daß man das Amperemeter in einen Nebenstromkreis

legt, in dem der Anodenstrom durch den Spannungsabfall des Heizfadens mit Hilfe eines Regulierwiderstandes gerade kompensiert wird.

Bei dieser Schaltung steht die ganze Skala des Meßinstrumentes für die Stromschwankungen, die durch Änderung des Gitterpotentials hervorgerufen werden, zur Verfügung, während sonst ein großer Teil des Ausschlags durch den normalen Anodenstrom verbraucht würde. Ferner ist hierbei eine bessere Konstanz des Nullpunktes gewährleistet. Denn würde bei längerer Beanspruchung die Spannung der Heizbatterie absinken, so müßte sich die Elektronenemission und damit die Stärke des Anodenstromes verringern; zugleich nimmt aber die Stärke des Kompensationsstromes, der ja auch von der Heizbatterie geliefert wird, ab, so daß die Änderung des Nullpunktes nur gering wird.

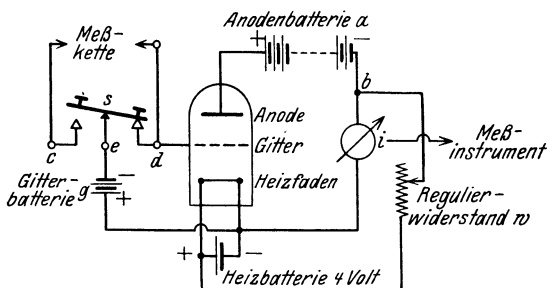


Abb. 53.

Nach dem Schema der Abb. 53 ist der Apparat nach Berl, Herbert und Wahlig konstruiert. In die Deckplatte des Apparates sind Elektronenröhre, Galvanometer von einer Empfindlichkeit von ungefähr  $10^{-6}$  A pro Teilstrich und die für die Messung notwendigen Schalter und Anschlußbuchsen eingelassen. Als Anodenspannung wird eine Akkumulatorenbatterie von 90—100 V verwendet, die an den mit *A* bezeichneten Buchsen angelegt wird. Als Heizbatterie dient ein 4-V-Akkumulator, der bei *H* anzuschließen ist. Um die Gewißheit zu haben, daß die zu messenden Potentiale in den geradlinigen Teil der Charakteristik hineinfallen, ist eine Gitterbatterie von 1,3 V in den Apparat an der Unterseite eingefügt (s. Schema Abb. 51). Der Regulierwiderstand ist in 2 Einzelwiderstände zerlegt, von denen der eine zur Grob-, der andere zur Feineinstellung dient. Vor das Galvanometer ist ein Shunt geschaltet, mit dessen Hilfe die Zeigerausschläge beliebig

verkleinert werden können; man kann auf diese Weise die Empfindlichkeit auf Kosten des Meßbereiches und umgekehrt den Meßbereich auf Kosten der Empfindlichkeit nach Belieben variieren. Der in Abb. 53 mit  $S$  bezeichnete Hebel kann auf „ $M$ “ (Messen) oder „ $E$ “ (Eichen) gestellt werden, je nachdem man die zu messende Kette (Meßkette) oder das Potential Null an das Gitter anlegen will.

Vor der eigentlichen Messung muß zunächst der Nullpunkt eingestellt werden, d. h. der Widerstand muß so einreguliert werden, daß im Galvanometer Stromlosigkeit herrscht, wenn an der Meßkette das Potential Null liegt. Der Zeiger des Galvanometers nimmt dann diejenige Stellung ein, die er hat, wenn der entarretierte Apparat genauest horizontal eingestellt und vollkommen stromlos ist. Zu diesem Zwecke wird der Schalthebel auf „Eichen“ gestellt, die Röhre eingesetzt und Heiz- und Anodenspannung angelegt. Man nimmt dann die Kompensation vor, indem man zunächst mit dem Grobregulierwiderstand den Galvanometerzeiger annähernd auf Null einstellt. Unter allmählicher Ausschaltung des Galvanometer-shunts und gleichzeitiger Nachregulierung mit dem Grob- und später dem Fein-Regulierwiderstand wird die Kompensation bis zu vollständiger Ausschaltung des Shunts fortgesetzt. Da der Nullpunkt nicht längere Zeit konstant liegen bleibt, muß vor jeder späteren Ablesung der Schalthebel kurz auf „Eichen“ gestellt und der Nullpunkt kontrolliert und evtl. mit Hilfe des Fein-Regulierwiderstandes wieder eingestellt werden. Dieselbe Zeigerstellung des Galvanometers besteht natürlich auch dann, wenn durch Umlegen des Hebels  $s$  auf  $M$  (Messen) die Meßkette eingeschaltet wird und diese das Potential Null besitzt. Der so bestimmte Nullpunkt ist zugleich als Eichpunkt der Galvanometerskala zu benutzen, wobei ihm die Potentialdifferenz Null und damit ein bestimmter  $p_h$ -Wert zuzuordnen ist.

Zur Eichung der Skala auf  $p_h$ -Einheiten ist noch mindestens ein Punkt mit einer Lösung von bekanntem  $p_h$  festzulegen. Zu diesem Zweck wird der Shunt wieder vollkommen eingeschaltet und die Meßkette an die mit  $X$  bezeichneten Buchsen geschlossen; darauf wird der Schalter auf „Messen“ gestellt, wodurch das Meßkettenpotential an das Gitter angelegt wird, und der Shunt so weit wieder ausgeschaltet, bis der Zeiger des Galvanometers um einen geeigneten Winkel ausschlägt. In der zuletzt festgelegten Stellung muß der Shunt während aller folgenden Messungen unverändert stehen bleiben.

Bei der Messung einer unbekanntenen Lösung wird nach kurzer Kontrolle des Nullpunktes der Galvanometerausschlag abgelesen

und der zugehörige  $p_{\text{H}}$ -Wert durch geradlinige Inter- bzw. Extrapolation bestimmt.

Die beschriebene Anordnung eignet sich gut für Chinhydron-Chinhydronelektroden oder Wasserstoff-Wasserstoffelektroden. Jedoch bei Gebrauch einer gesättigten Kalomelelektrode als Bezugselektrode, deren Anwendung wegen ihrer außerordentlichen Vorzüge dringend erwünscht ist, entstehen gewisse Schwierigkeiten. Denn die hierbei auftretenden Potentialdifferenzen sind verhältnismäßig groß und die durch  $p_{\text{h}}$ -Änderung auftretenden Verschiedenheiten der Potentialdifferenzen demgegenüber relativ klein, so daß nur ein kleiner Bruchteil der Galvanometerskala für die eigentliche  $p_{\text{h}}$ -Messung zur Verfügung steht. Diese Schwierigkeit läßt sich nach einer Anordnung von H. Fischgold<sup>1)</sup> leicht umgehen, indem man beim Einstellen des Nullpunktes an das Gitter nicht die Potentialdifferenz Null sondern eine bestimmte Spannung anlegt, die aus einem passend gewählten Normalelement bezogen wird; geeignet hierfür sind Kombinationen von Weston- (1,018 V), Clark- (1,425 V), Babinski-Elementen. Das Babinski-Element besteht aus dem System Quecksilber-Kalomel,  $\left(\frac{n}{1} \text{NaCl} + \frac{n}{4} \text{HCl}\right)$ ,  $\text{PbCl}_2$ , Pb-Amalgam und hat eine EMK von 0,530 V.<sup>2)</sup> Mit Hilfe von Normalelementen lassen sich auch die

<sup>1)</sup> Nicht veröffentlicht.

<sup>2)</sup> Babinski: Diss. Leipzig 1906.

Herstellung des Normalelementes nach Babinski. Als Elementgefäß dient das auch bei anderen Normalelementen übliche H-Gefäß. In den einen Schenkel des Gefäßes wird durch Filtrieren und Schütteln mit Merkuronitratlösung gereinigtes Quecksilber, in den anderen Schenkel ein Bleiamalgam gebracht, das einen Bleigehalt von 2 bis 66 Atomprozenten haben soll und das durch Zusammenschmelzen der entsprechenden Blei- und Quecksilbermengen gewonnen wird; man nimmt am besten einen mittleren Wert, also, da das Atomgewicht des Bleies (207,22) annähernd gleich dem des Quecksilbers ist (200,61), ein Amalgam mit einem Bleigehalt von ca. 30 Gewichtsprozent. Als Zwischenflüssigkeit dient eine Lösung, die durch Zusammengießen von gleichen Teilen einer  $\frac{n}{2}$  HCl-Lösung und einer 2 n-NaCl-Lösung hergestellt wird.

Auf das Bleiamalgam wird eine Schicht von festem  $\text{PbCl}_2$ , auf das Quecksilber ein Gemenge von  $\text{HgCl}$  und  $\text{PbCl}_2$  gebracht. Man geht dabei so vor, daß man das  $\text{PbCl}_2$  bzw. das Gemenge  $\text{HgCl}$  und  $\text{PbCl}_2$  mit der Zwischenflüssigkeit schüttelt, nach Niedersetzung der Salze die klare Flüssigkeit dekantiert, das Verfahren noch einmal wiederholt; beim dritten Mal werden die Salze 10 Min. lang geschüttelt und dann 15 Min. stehen gelassen. Die klaren Flüssigkeiten werden jetzt in saubere Gefäße abgegossen und zur späteren Einfüllung in das Element aufbewahrt, die Salze auf die entsprechenden Metalle in den Schenkeln des H-Gefäßes aufgetragen und danach

anderen Eichpunkte festlegen, so daß die Einstellung mit genau bekannten Vergleichslösungen überflüssig wird. Mißt man beispielsweise bei  $20^{\circ}$  mit ges. Kalomel-Wasserstoffelektrode, so entspricht

0,407 V (Clark- minus Weston-Element)	einem $p_h$ von	2,72
0,488 V (Weston- minus Babinski-Element)	„ „ „	4,12
0,530 V (Babinski-Element)	„ „ „	4,84
0,611 V (2 × Weston- minus Clark-Element)	„ „ „	6,23
0,895 V (Clark- minus Babinski-Element)	„ „ „	11,12

Je nach Lage des gewünschten Meßbereiches wird man für den Nullpunkt und die notwendigen Eichpunkte eine passende Kombination auswählen können.

Da der genannte Apparat es nicht ohne weiteres gestattet, bekannte Spannungen in den Eichkreis (zwischen die Punkte  $e$  und  $d$  in Abb. 53) hineinzulegen, ist es zweckmäßig, folgende Schaltung vorzunehmen:

An die Buchsen für die Aufnahme der Meßkette (mit  $X$  bezeichnet) wird nicht diese direkt angelegt, sondern ein Auswählschalter, der es erlaubt, je nach Bedarf die Nullpunktsspannung, eine Eichspannung oder die Meßkettenspannung an das Gitter zu legen (Abb. 54). Der Schalthebel auf der Deckplatte des Apparates muß dabei natürlich dauernd auf „ $M$ “ gestellt bleiben. Hat man nun z. B.  $p_h$ -Bestimmungen in einem Bereich von ungefähr  $p_h$  4 bis  $p_h$  7 vorzunehmen, so würde man zweckmäßig als Nullpunktsspannung das Babinski-Normalelement in Kreis 2

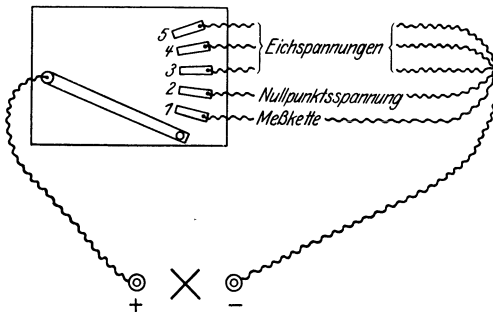


Abb. 54.

der Abb. 54 hineinlegen, dessen Spannung von 530 Millivolt einem  $p_h$  von 4,84 entspricht. Als einen weiteren Eichpunkt könnte man

die zugehörigen Lösungen gleichzeitig darüber eingegossen. Schließlich werden die beiden Schenkel verkorkt und mit Paraffin überzogen.

Zwischen  $t = 0^{\circ}$  bis  $30^{\circ}$  hat das Element eine EMK von  $0,5304 + (t - 30) 0,00013$  V.

die Spannung von 488 Millivolt, einem  $p_h$  von 4,12 entsprechend, benutzen, die man erhält, wenn man die EMK des Weston-Elementes um die EMK des Babinski-Elementes vermindert (indem man die beiden negativen Pole der Elemente verbindet und den positiven Pol des Weston-Elementes als positiven Pol, den positiven Pol des Babinski-Elementes als negativen Pol der Eichkette schaltet). In analoger Weise können noch andere Eichpunkte festgelegt werden. Nachdem man in der oben angegebenen Weise den Nullpunkt reguliert (Kreis 2) und die Galvanometerskala geeicht hat (Kreis 3, 4...), schaltet man die zu untersuchende Meßkette (Wasserstoffelektrode mit der Lösung mit dem unbekanntem  $p_h$  — gesättigte Kalomelektrode) ein (Kreis 1),

Enzym	Bemerkung	Aziditäts- optimum d. Wirksamkeit	
Lipasen	Pankreas	8	
	ungereinigt	menschl. Serum	8
		Frauenmilch	8
		Darm, Säugling	8,5
		Magen, Säugling	5—4
		Serum	8
	Pankreas (Mensch u. Hund)	6,95—8	
	Schweinepankreas	8—9 abhängig v. Aktivatoren	
In höheren Pflanzen	gereinigt	Lipase aus Pankreas u. Magen des Schweines	8—9
		aus Rizinus	4,7—5,0
	Azetatpuffer (0,5—0,1 norm.)	5,0	
Amylasen	Chlorid-A. 6,7 Nitrat-A. 6,9 Phosphat-Sulfat Azetat-A. 6,1—6,2	6	

liest auf der Galvanometerskala den sich ergebenden Wert ab und erhält durch geradlinige Interpolation den unbekanntem  $p_h$ -Wert<sup>1)</sup>.

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

<sup>1)</sup> Entsprechend angeordnete Löcher in einem Paraffinblock (z. B. in einer Petrischale), die mit Quecksilber gefüllt sind und mit einem Kupferbügel untereinander leitend verbunden werden können, stellen die erwünschte Schaltung ohne Schwierigkeit her.

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	
Willstätter, Wald- schmidt-Leitz und Memmen	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 93 u. 132. 1923	Willstätter und Mem- men: Zeitschr. f. phy- siolog. Chem. Bd. 129, S. 1. 1923
Willstätter und Mem- men	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 Zah- len (Biochem. Zeitschr. Bd. 36) berechnete Azi- dität 3,7—2,9 ist zu hoch
Willstätter u. Wald- schmidt-Leitz	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 161. 1924	
Michaelis und Pech- stein	Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 77. 1914	

Enzym	Bemerkung	Aziditäts- optimum d. Wirksamkeit
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. $\alpha$ -Methylglukosidase	aus Bierhefe	6,2—6,8
		6,8
Saccharase in tier. Organen	Darm (Mensch)	5—7
in Pflanzen . . . . .	Kartoffel	4
in Hefen . . . . .	52,1 <sup>0</sup>	4,4—4,6
	22,3 <sup>0</sup>	4,2



Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
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	Michaelis (Monograph.) 6,7—5.
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.	
Euler u. Svanberg	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 112, S. 193. 1921	Michaelis (Monograph.) 6,7—5.
Adler Falk	Biochem. Zeitschr. Bd. 77 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	
Willstätter, Kuhn, Sobotka	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 224. 1924	Willstätter und Steibelt: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 199. 1921
Euler und Svanberg	Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 43, 1921	
Falk	Gen. Phys. Bd. 2	
Sörensen	Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131. 1909	
Michaelis und Davidsohn	Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 386. 1911	Euler und Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 120, S. 1. 1922. Euler, Josephson und Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134. 1924

Enzym	Bemerkung	Aziditäts- optimum d. Wirksamkeit
	in frischen Hefezellen	4,2—5,2
in Takadiastase . . . . .		5,0—5,5
in Penicill. glaucum.		5
Laktase:	in Emulsin	4,2—4,6
	in Milchzuckerhefen	7
$\beta$ -Glukosidase . . . . .	Substrat Salizin	4,4
		4,7
	Substr. $\beta$ -Methylglukosid	4,4
Urease . . . . .	$p_n$ -Optimum ändert sich etwas mit der Harnstoffkonzentrat.	7,2—7,5
Magen-Pepsin . . . . .	Verdauung von Azidalbumin bei 37°	1,6—1,8
	Verdauung von Edestin bei 37°	1,4
	Eier-Albumin	2,2—2,5

Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
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 $\beta$ -Glukoside, 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 $\beta$ -Glukoside 4,4 bis 5,3.
v. Slyke und Zacha- rias	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. Zeit- schrift Bd. 111, S. 115. 1920
Sörensen	Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131. 1919	Michaelis und David- sohn: Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 8, S. 2. 1910
Michaelis und Men- delsohn Northrop	Biochem. Zeitschr. Bd. 61, S. 1. 1914 Journ. of gen. physiol. Bd. 2, S. 113. 1920; Bd. 3, S. 211. 1920	Ringer: Arch. neer- land. de physiol. de l'homme et des anim. Ferner Zeitschr. f. phy- siolog. Chem. Bd. 95 u. Kolloid-Zeitschr. Bd. 19 Okada: Journ. of bio- chem. Bd. 10

Enzym	Bemerkung	Aziditäts- optimum d. Wirksamkeit
	Gelatine	2—2,8
	Serum-Albumin	2,0
Hydrolyt. Bestandteile des Chymosins . . . . .	Substrat Kasein	5
Pankreas-Trypsin	verschiedene Substrate	7,4—10
	Gelatine	8,2—8,7
Pankreatin (Trypsin-Erepsin-Mischung)	Peptonspaltung 37°, Formol- methode 37°	8
		8
Tryptase aus Rindsdarm	Kasein 37°	9
Erepsin aus Schweinsdarm	Substrat Glyzylglyzin 37°	8,6
Erepsin (Hefepreßsaft)	Glyzylglyzin 37°	7,8
Proteolyt. Enzyme im Auto- lyse-Saft der Hefe (Enzym- gemisch nach Vines)	Setzt sich nach Dernby zu- sammen aus: Pepsin Opt. 4,5, Tryptase Opt. 7,0, Ereptase Opt. 7,8	6
Proteolyt. Enzyme im Hefe- Mazerationssaft	Spaltung von Polypeptiden. Opt. nach Abderhalden u. Fodor abhängig von Substrat	6,7—8,5
Proteolyt. Enzyme im Auto- lysesaft von tier. Geweben und Leukozyten	Setzt sich nach Dernby zu- sammen aus: Pepsin Opt. 3,0 bis 3,5, Trypsin Opt. 7,8, Erepsin Opt. 7,8	
Leber . . . . .		3,6—3,9
Proteolyt. Enzyme verschiede- ner Organe:		
Pferdenieren . . . . .	a) Kasein b) Pepton	4,3—5,6 4,8

Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
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	Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 280. 1911	
Kurt Meyer	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	
Abderhalden und Fodor	Fermentforschung Bd. 1, S. 533. 1916. Siehe dazu Dernby: l. c.	
Rona und Mislowitz	Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 517. 1923	
Hedin	} Zeitschr. f. physiolog. } Bd. 122, Chem. S. 307. } 1922	

Enzym	Bemerkung	Aziditäts- optimum d. Wirksamkeit
Lymphdrüsen . . . . .	a) Kasein b) Kasein c) Pepton	5,5 9—10 8
Milz . . . . .	a) Kasein b) Kasein c) Pepton	etwa 5,4 8,8 7,5—8,5
Chymosin . . . . .	Optimum d. Labfällung des Kaseins in Gegenwart v. Ka.	6,4—6,0 5 (?)
	Umwandl. Kasein in Parakas.	6,0—6,4
Enzym-Komplex d. al- kohol. Gärung	in lebend. Hefe ohne Stick- stoffnahrung 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 Neutral- salzen	etwa 7
	Leber	etwa 7

## Aktivatoren und Paralysatoren.

Alle Stoffe bekannter oder unbekannter chemischer Zusammen-  
setzung, welche die Geschwindigkeit des Umsatzes erhöhen, können  
Aktivatoren genannt werden, und wenn sie die Geschwindigkeit  
herabsetzen, Paralysatoren. Der Mechanismus dieser Förderung  
oder Hemmung ist häufig unbekannt. Als Möglichkeiten kommen  
in Frage: Änderung der aktuellen Azidität, Salzwirkungen, Ände-  
rung der Dissoziation der Ferment-Substratverbindung, Ände-

Autor	Schriftstelle	Weitere Literatur
	} Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 289. 1923	
	} Biol. Chem. Bd. 54, S. 177. 1922	
Michaelis und Mendelsohn van Dam	Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 305. 1914 Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 64, S. 316. 1910	
Rona und Gabbe	Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 39. 1922  Svenska Vet. Akad. Ar- kiv f. Kemi Bd. 7, S. 21. 1919	Euler und S. Karlsson: Biochem. Zeitschr. Bd. 130, S. 550. 1920
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 Dambovicenu	Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 20. 1922	

rung der Affinität von Enzym und Substrat, Beeinflussung der Adsorptionsbedingungen (Adsorptionsherstellung oder Verdrängung [Lipasen]). Aktivator bekannter Konstitution ist z. B. das Kochsalz als Aktivator für die tierischen Amylasen, von unbekannter Konstitution sind das Co-Enzym der Gärung und die Enterokinase des Trypsins. Hier sei noch auf die Rolle der Blausäure beim Papain (vgl. S. 345) und die Wirkung des Schwefelwasserstoffs auf das Kathepsin (Waldschmidt-Leitz, Grassmann) hingewiesen.

Bei den Paralysatoren 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 Katalasewirkung durch HCN<sup>2)</sup> oder die Hemmung einzelner Lipasen durch Alkaloide, bes. Chinin<sup>3)</sup> (vgl. S. 125). Schön läßt sich eine reversible Vergiftung am Beispiel der Wirkung von KCN auf die Katalasewirkung zeigen (vgl. S. 369).

Hier wären auch die sogenannten spezifischen Hemmungen durch die Abbauprodukte zu erwähnen<sup>4)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Euler u. Svanberg: Fermentforschung Bd. 3, S. 330. 1920; Zeitschrift f. physiolog. Chem. Bd. 114, S. 137. — Euler u. Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 121, S. 177. 1922; Bd. 125, S. 298. 1923. — Euler u. Waller: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 167. 1924.

<sup>2)</sup> Vgl. z. B. Rona, Fiegel u. Nakahara: Biochem. Zeitschr. Bd. 160, S. 272. 1925.

<sup>3)</sup> Siehe Rona u. Mitarbeiter: Biochem. Zeitschr. Bd. 118, S. 185, 213. 1921; Bd. 130, S. 225, 582. 1922; Bd. 134, S. 108, 130. 1923.

<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. Fettspaltende Fermente (Esterasen, Lipasen).

Die Esterasen bzw. Lipasen spalten Fette und Ester in ihre Komponenten Alkohol (Glyzerin) und Säuren. Pankreaslipase, Leberlipase und Magenlipase verhalten sich verschiedenen razemischen Substraten gegenüber stereochemisch verschieden.

Die Pankreaslipase verschiedener Tiere wirkt gleichmäßig auf Fette und Tributyrin, Triazetin, 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, Triazetin usw.). Alle Glyzerinester 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 Glyzerin. In Glyzerin 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 die Ölspaltung 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 kapillaraktiven Stoffe<sup>1)</sup>. Glyzerin wirkt bis 30% aktivierend, sowohl bei Olivenöl als auch bei Methylbutyrat als Substrat.

Förderung und Hemmung sind aber auch von der chemischen Zusammensetzung der Substrate und der Substratkonzentration abhängig. Auf die Tributyrinhydrolyse übt das Albumin in Gegen-

---

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

wart von Natriumoleat, das selbst ein guter Aktivator ist, einen aktivierenden Einfluß aus.

Darstellung: a) Nach Rosenheim<sup>1)</sup>. Frisches, feingehacktes Schweinepankreas wird mit 2 Gewichtsteilen Glycerin angerührt und nach 24 Std. durch ein feines Tuch kolliert. Von der stark opaleszierenden Flüssigkeit wird ein Teil, z. B. 30 cm<sup>3</sup>, 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 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> 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. 279 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 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 bei neutraler und bei saurer Reaktion durch Aluminiumhydroxyd und durch Kaolin leicht adsorbieren. Ihre sauren Eigenschaften sind stärker ausgebildet als diejenigen von Amylase und Trypsin. Der Adsorptionswert ist die Enzymmenge in Lipaseeinheiten (vgl.

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

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

S. 124 und 127), die von 1 g Adsorbens unter bestimmten Bedingungen aufgenommen wird. Anders als beim Invertin, das mit steigendem Reinheitsgrad viel reichlicher adsorbiert wird, findet man bei Lipase kein Anwachsen des Adsorptionswertes bei steigendem 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 mit n-Essigsäure angesäuert (30 cm<sup>3</sup>) und mit einer Tonerdesuspension der Darstellung B geschüttelt (vgl. S. 5) (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% 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 (Glyzeringehalt: 50%). Die Elution enthält  $\frac{2}{3}$  der angewandten Lipase, begleitet von nur  $3\frac{1}{2}$ % der anfangs vorhandenen Amylase. Zur zweiten Adsorption wird zuerst die Phosphorsäure entfernt. Die 50% 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. Magnesiumazetatlösung (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, ohne zu waschen, zweimal mit je 500 cm<sup>3</sup> „Ammonphosphat“ eluiert, die Lösungen abzentrifugiert (5 Min., 3600 Touren) und vereinigt. Die Elution enthielt 35% der Lipase des geklärten Glycerinauszuges.

Das Resultat kann noch verbessert werden, wenn die Konzentration des Glycerins bei Ausfällung der Phosphorsäure nur 10 bis

15% beträgt und das Fällungsmittel langsam unter kräftigem Umschütteln eingetragen wird.

Eine weitere Reinigung des Fermentes gelingt durch Adsorption 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 Umdrehungen 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 und muß deshalb aus den Elutionen ausgefällt werden. — 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

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 182. 1922.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 191. 1922.

sorgfältig mit Wasser gewaschen und das Präparat 2—3 Tage im Hochvakuum zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Herauslösen des organischen Adsorptionsmittels geschieht mittels Benzols (je 250 cm<sup>3</sup>), das ungelöste Ferment wird mittels der Zentrifuge getrennt, wiederholt in den Zentrifugengläsern mit Benzol, absolutem Alkohol und reinem Äther gewaschen und getrocknet. Es sei bemerkt, daß mit der Dialyse der glyzerinhaltigen Enzymlösung eine irreversible Inaktivierung der Lipase einhergeht. Die besten Präparate erhält man durch aufeinanderfolgende Adsorption an Tonerde (2mal), an Kaolin und an Tristearin (oder Cholesterin).

### Leberesterase.

Darstellung nach Willstätter und Memmen<sup>1)</sup>. Wie bei der Fermentdarstellung aus Pankreas, wird die entfettete Leber (meist vom Schwein) mit Azeton und Äther getrocknet und das Ferment aus dem staubfein gemahlene Leberpulver mit Wasser oder Glycerin in Lösung gebracht (vgl. S. 112). 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 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>—2 Std. stehen und zentrifugiert; diese Behandlung wird mehrere Male wiederholt. Die erhaltenen Lösungen werden vereinigt und im warmen Luftstrom abgedampft<sup>2)</sup>. — Reinere Esteraselösungen gewinnt man mit Glycerin, sie waren aber für die folgenden Reinigungsoperationen wenig geeignet. Beim Fällen mit Alkohol und Äther verliert das Enzym seine Wirksamkeit.

Man kann mittels Kaolin oder Tonerde aus saurer Lösung bei  $p_h = 4,2$  bis 4,4 (eingestellt mit Ammonazetat-Essigsäuremischung) den größten Teil der Lipase adsorbieren. Für alle Elutionen ist verdünntes Ammoniak (0,25 n) ausreichend.

Beispiel<sup>1)</sup>: Durch Ausziehen mit verdünntem Ammoniak und Abdampfen gewonnenes 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<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) und abzentrifugiert. Mit 0,25-n-Ammoniak (1500 cm<sup>3</sup>) wird das Adsorbat eluiert, sofort

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 138, S. 216 (237). 1924.

<sup>2)</sup> Kraut, Lobinger und Pollitzer (Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 62, S. 1939. 1929) beschreiben eine Apparatur zur Vakuum-Destillation empfindlicher Lösungen, die sich auch eignete, um eine Leberesterase-Lösung ohne Abnahme ihrer Wirksamkeit bei 22<sup>0</sup> Dampftemperatur auf den 4. Teil einzuengen.

zentrifugiert und im Vakuum<sup>1)</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 $\frac{0}{0}$  von dem Ferment verloren<sup>2)</sup>.

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. 5) (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 $\frac{0}{0}$  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>3)</sup>. Der Preßsaft der Rinderleber wurde mit dem 3fachen Volumen Glycerin versetzt und im Vakuumexsikkator 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 mit Äthylbutyrat und Monobutyryn 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 wurde mit CaCl<sub>2</sub> und NaOH versetzt und nochmals filtriert. Das stark wirksame, klare Filtrat gab durch Zusatz von wenig Säure (etwa  $p_h = 6,2$ )

<sup>1)</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>2)</sup> Zur Elektrodialyse vgl. Willstätter u. Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 193 (208). 1923; ferner Fricke u. Kaja: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 57, S. 310. 1923/24 und S. 15 dieses Werkes. — Über Versuche zur weiteren Reinigung vgl. Kraut und Rubenbauer: Zeitschr. physiol. Chem. Bd. 173, S. 103. 1928.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. exp. Pharmakol. u. Pathol. Bd. 97, S. 242. 1923.

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>1)</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 zu Brei zerkleinert und in die doppelte Menge Azetons eingetragen. Nach 2 Std. wird sie nochmals in dieselbe Menge frischen Azetons gebracht. Das mit Äther und Azeton gewaschene und getrocknete Material wird zu einem sehr feinen Pulver zermahlen. Der Kardia- teil der Schleimhaut vom Schwein ist viel reicher an Lipase als der Fundusteil; beim Hund war eine Teilung in Kardia, 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 Azetatt- puffer ( $p_h = 4,7$ ) haltbar gemacht werden. Man kann konzen- triertere Lipaselösungen erhalten, wenn man nach Zusatz von 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Glycerin im Hochvakuum bei 15<sup>0</sup> zur Sirupdicke eindampft.

Durch Ausflockung mittels Essigsäure wird ein großer Teil des Fermentes mit dem ausfallenden Muzin 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 Essig- säure. 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, sehr stark verdünnt und durch Kaolin adsorbiert. Die Elution wird mit glyzerinhaltigem, 2<sup>2</sup>/<sub>3</sub>-basischem Ammonphos- phat vorgenommen (40 Volumteile 87<sup>0</sup>/<sub>0</sub>iges Glycerin).

Weder am ammoniakalischen Auszug der frischen Schleim- haut des Hundemagens, noch an den reineren Lösungen wirken Kalziumoleat mit Albumin aktivierend. Bei der Schweinemagen- lipase wirkte Natriumoleat aktivierend. Gegen gallensaure Salze

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 247. 1924 und Bd. 140, S. 203. 1924. Vgl. auch Willstätter und Bamann: Ebenda Bd. 173, S. 17. 1928.

verhalten sich die verschiedenen Präparate ungleich. Mit fortschreitender Reinigung schwinden jedoch die Unterschiede zu den Aktivatoren gegenüber der Pankreaslipase.

Zur Gewinnung der Darmlipase hat Hamsik<sup>1)</sup> die abgeschabte Schleimhaut mit Alkohol, Alkoholäther, schließlich mit Äther (zusammen höchstens 5 Stunden, da Alkohol und Äther die Lipase schädigen) 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 Globulinfraction 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).

### Rizinuslipase.

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>3)</sup>.

Nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz bereitet man aus den geschälten Rizinusbohnen (*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 Umdrehungen 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,

<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.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 161 (205). 1924. (Vgl. hierzu auch die Unterscheidung von Blastolipase und Spermatolipase.)



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 Zentrifugenglase noch 3mal mit 30 cm<sup>3</sup> Äther gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Eine weitere Reinigung läßt sich durch Einwirkung wässriger, eiweißlösender Reagentien auf die Fermentsahne erzielen, so z. B. aufeinanderfolgende Behandlung mit 0,7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5% KOH und 0,5% HCl.

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>1)</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 der Oberflächenspannung wird mittels der Tropfmethode gemessen.

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

2. Gesättigte Tributyrinlösung: Man schüttelt 20 Tropfen Tributyrin mit 1 l Wasser nicht zu heftig 1—2 Stunden im Schüttelapparat. Danach läßt man den ungelösten Teil des Tributyrins durch kurzes Stehenlassen der Flüssigkeit abscheiden und filtriert. Das Filtrieren wird in der Weise ausgeführt, daß man die zuerst durchfiltrierende Flüssigkeit verwirft und erst dann die eigentliche Flüssigkeit auffängt. Beim Filtrieren muß der Trichter stets ganz mit der zu filtrierenden Lösung gefüllt sein. Auch das letzte Filtrat wird wieder verworfen. Diese Vorsichtsmaßnahmen sind deshalb wichtig, um zu vermeiden, daß kleine Tributyrinpartikelchen in die Flüssigkeit gelangen, die dann die Oberflächenspannungswerte stark beeinflussen können. Die Lösung hält sich etwa 12 Std. Sie muß jedesmal frisch bereitet werden.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 31, S. 345. 1911 und Rona: Handb. der Biochem. Arbeitsmethoden S. 302. 1915.

3. Pufferlösung von geeignetem  $p_h$ . Es ist zweckmäßig, die Tributyrinlösung gleich zu puffern. Hierbei empfiehlt

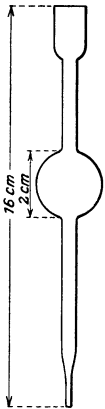


Abb. 55.

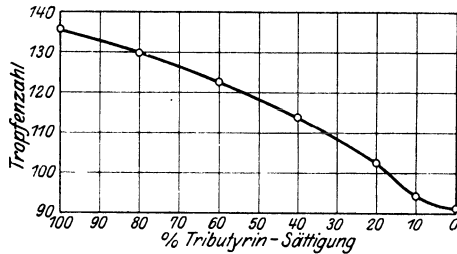


Abb. 56.

sich folgender Ansatz: Je  $100 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$  versetzt man mit  $1 \text{ cm}^3 \frac{1}{3} \text{ mol. NaH}_2\text{PO}_4$  und  $7 \text{ cm}^3 \frac{1}{3} \text{ mol. Na}_2\text{HPO}_4$  ( $p_h = \sim 7,5$ , Darstellung s. S. 121). (Das Tributyrin — unverdünnt — kann statt zum reinen dest. Wasser zu dieser Pufferlösung zugefügt werden.)

Ausführung: Man eicht zunächst die Tropfpipette (Abb. 55) für Wasser bei  $18^\circ$ , dann für die gesättigte Tributyrinlösung 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 Tributyrin-gehalt einer Lösung (in Prozenten der gesättigten Lösung) aus der Tropfenzahl bestimmen [Abb. 56].  $1\text{--}2 \text{ cm}^3$  der Fermentlösung werden mit  $50 \text{ cm}^3$  Mono- oder Tributyrinlösung unter Zusatz von  $2 \text{ cm}^3$  des entsprechenden Puffers (falls die Tributyrinlösung nicht gepuffert ist) 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

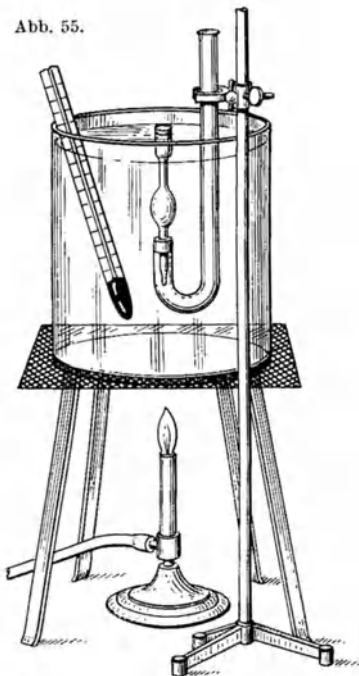


Abb. 57.

abfallenden Tropfen, die beim Ausfließen der Flüssigkeit zwischen den beiden Marken der Kapillare 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 Kapillare langsam wegzieht (Abb. 59). — Aus der Eichkurve kann man den jeweilig noch vorhandenen Tributyringehalt (in Proz.) ablesen.

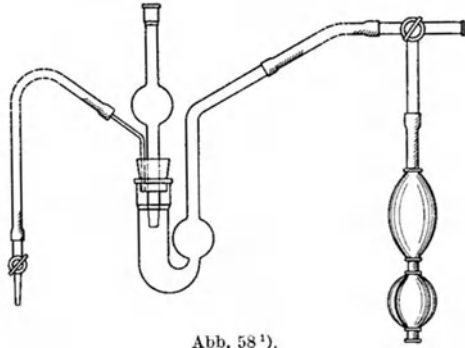
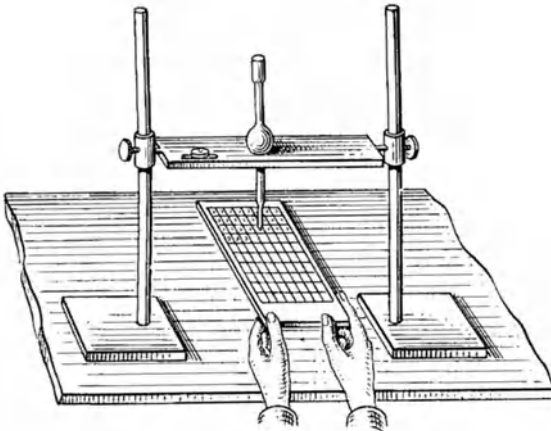
Abb. 58<sup>1)</sup>.

Abb. 59. (Anordnung nach Dr. Bien.)

Beispiel: 50 cm<sup>3</sup> gesättigte wässrige Tributyrinlösung wurden mit 3 cm<sup>3</sup> Phosphatgemisch ( $\frac{1}{3}$  molar)<sup>2)</sup> verschiedener Zusam-

<sup>1)</sup> Die Anordnung von Steffanutti (Abb. 58) ist noch vorteilhafter. Vgl. Biochem. Zeitschr. Bd. 223, S. 421. 1930.

<sup>2)</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

Regulatorgemisch	[H]	$p^h$	Tropfenzahl nach Minuten				Vorhandenes Tributyrin in Prozenten nach Minuten			
			0	12	24	48	0	12	24	48
			elektrometrisch gemessen							
1 prim. Phosphat: 10 sek. Phosphat . . .	$1,30 \cdot 10^{-8}$	7,90	146	138	130	118	100	85	66	40
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: 100 sek. Phosphat . . .	$9,20 \cdot 10^{-9}$	8,04	146	146	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 n/10-NaOH . . . . .	$1,29 \cdot 10^{-8}$	7,93	146	146	146	145	100	100	100	98

mensetzung, dann mit  $1 \text{ cm}^3$  5fach verdünntem Blutserum vom Kaninchen versetzt. Die Tabelle (S. 122) zeigt gleichzeitig den Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Schnelligkeit der Spaltung.

Bei stark alkalischer Reaktion, etwa von  $p_h = 9$  an, müssen bei der entsprechenden Reaktion Kontrollversuche mit aufgekochtem bzw. mit NaF versetztem Blut bzw. Serum angesetzt werden. Will man nicht bei Zimmer-, sondern höherer Temperatur arbeiten, so ist eine aus den Abb. 57, 58 ersichtliche Anordnung zu empfehlen<sup>1)</sup>.

Eine (relative) quantitative Bestimmung des fettspaltenden Ferments wird aus dieser Methode auf folgendem Wege erhalten. Man wiederhole diesen Versuch mit einer Reihe normaler menschlicher Blutsera und betrachte nun die einzelnen Diagramme. Notwendig sind nur die Zeit-Tropfenzahl-Diagramme; die Zeit-Konzentrationsdiagramme sind entbehrlich. In den verschiedenen Diagrammen vergleiche man die Zeiten gleicher Tropfenzahl. Beispielsweise findet man: Tropfenzahl an einer Kontrolle, welcher statt Serum die gleiche Menge Wasser zugesetzt wurde: 140. Das ist der wahre Anfangswert. In den ersten Messungen mit Serum wird man gleich etwas weniger finden. Nunmehr liest man an den Diagrammen die Zeit ab, nach welcher die Tropfenzahl 120 betrug. Dies sei bei 5 verschiedenen Normalserumproben 10; 11; 12; 9; 9 Minuten, im Mittel 10,0 Minuten. Ferner liest man ab, in welcher Zeit die Tropfenzahl 110 erreicht wurde. Dies sei 18; 19; 20; 16; 17 Minuten, im Mittel 18,0 Minuten.

Diese Zahlen können als bleibender Maßstab für künftige Versuche benutzt werden, sofern die Zimmertemperatur innerhalb  $2-3^{\circ}$  die gleiche ist. Findet man nun an einem pathologischen Serum z. B. von einer schweren Phthisis pulmonum

120 Tropfen in 30,0 Minuten  
110 „ „ 55,0 „

so würde aus der ersten dieser beiden Zahlen folgen, daß der Umsatz in 30 Minuten so weit ist, wie bei normalem Serum in 10 Minuten, und in 55 Minuten so weit ist, wie normalerweise in 18 Minuten. Die Fermentmengen verhalten sich umgekehrt wie die Zeiten gleichen Umsatzes; die erste Zahl gibt als eine Fermentmenge von  $\frac{10}{30}$ , die zweite von  $\frac{18}{55}$  des normalen, als Mittel von 0,33 und 0,31 also 0,32, bezogen auf normalen Fermentgehalt = 1.

Phosphates werden  $100 \text{ cm}^3$  1 mol. Phosphorsäure mit  $200 \text{ cm}^3$  n-NaOH versetzt.

<sup>1)</sup> Siehe Fußnote 1 S. 121.

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 Kalziumchlorid<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. Die Reinigung erfolgt durch elfmaliges längeres Ausschütteln von 50 g käuflichem Tributyrin mit je 400 cm<sup>3</sup> Wasser. 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> NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl-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 (siehe oben) 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 (Butyraseeinheit). Die Proportionalität zwischen Reaktionszeit und Enzymmenge hat genaue Geltung<sup>3)</sup>. Für die Analysenprobe genügt bei dieser Methode  $\frac{1}{100}—\frac{1}{500}$  der zur titrimetrischen Bestimmung (s. u.) angewandten Lipasemenge.

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

<sup>2)</sup> Es sei daran erinnert (S. 116), daß die Leberlipase (besser Leberesterase) im Gegensatz zur Pankreaslipase durch diese Zusätze nicht aktiviert, sondern gehemmt wird; die Methode ist also bei der Leberlipase ohne Aktivierung anzustellen.

<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.

Zur Feststellung von chinin- bzw. atoxylyfester Lipase nach Rona im menschlichen Blutserum (vgl. S. 110) schlägt Petow<sup>1)</sup> die folgende Anordnung vor. In vier Bechergläser von 100 cm<sup>3</sup> werden je 50 cm<sup>3</sup> gesättigte Tributyrinlösung gefüllt. Außerdem werden 3 Reagensgläser mit je 3 cm<sup>3</sup> des zu untersuchenden Serums gefüllt und in das erste Reagensglas noch 1 cm<sup>3</sup> 0,2proz. Lösung von Chininhydrochlor., in das zweite 1 cm<sup>3</sup> einer 0,1proz. Lösung von Atoxyl, in das dritte 1 cm<sup>3</sup> Wasser getan. In ein viertes kommen 3 cm<sup>3</sup> Ringerlösung und 1 cm<sup>3</sup> Wasser. In alle 4 Reagensgläser kommen außerdem je 3 cm<sup>3</sup> Pufferlösung (Phosphatpuffer  $\frac{1}{3}$  m.  $p_H$  7,6). Diese Gemische bleiben bei Zimmertemperatur  $\frac{1}{2}$  Stunde stehen. Danach wird Reagensglas Nr. 1 in Becherglas Nr. 1 entleert, umgerührt, die Tropfenzahl bestimmt und die Zeit notiert. Ebenso verfährt man der Reihe nach mit den übrigen drei Gläsern. Nach Verlauf von 30 Minuten und 60 Minuten wird in allen vier Gläsern wiederum die Tropfenzahl bestimmt. — Es empfiehlt sich, nach 60 Minuten den Versuch abzubrechen. Im normalen mit Chinin oder Atoxyl vergifteten Seren nimmt die Tropfenzahl nicht mehr als um drei in 1 Stunde ab. Ist im Reagensglas Nr. 1 resp. Nr. 2 die lipolytische Wirkung innerhalb der angegebenen Grenzen nicht völlig aufgehoben, so ist zu schließen, daß eine chinin- bzw. atoxylyfeste Lipase im Serum vorhanden ist<sup>2)</sup>.

### Titrimetrische Methoden.

Nach Willstätter<sup>3)</sup> mit ausgleichender Aktivierung.

Prinzip: Die Lipasewirkung ist nicht nur von der Wasserstoffionenkonzentration 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 Kalziumchlorid, Albumin und glykocholsaures Natrium, Albumin und Kalziumchlorid

<sup>1)</sup> Vgl. Oppenheimer-Pincussen: l. c. S. 1503. Vgl. hierzu auch Rona, Petow, Schreiber: Klin. Wochenschr. 1922, S. 2366. — Petow und Schreiber: Klin. Wochenschr. 1923, S. 1248.

<sup>2)</sup> Demuth (Biochem. Zeitschr. Bd. 150, S. 392. 1924) macht darauf aufmerksam, daß bei Milchuntersuchungen auf Lipase das Fett der Milch oder bei anderen Fragen ein evtl. Kaseingehalt die Tropfenzahl des Tributyrins mehr oder weniger stark herabsetzt. In solchen Fällen ist daher immer eine besondere Eichkurve anzustellen. Vgl. auch Gottstein: Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 106, S. 97. 1924.

<sup>3)</sup> Willstätter, Waldschmidt-Leitz, Memmen: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 93 (S. 111). 1923.

und gallensaures Salz. Als Substrat dient Olivenöl. Die entstandene Säure wird mittels alkoholischer Kalilauge titriert.

Willstätter wendet drei Bestimmungsweisen an:

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

2. Im alkalischen Medium ( $p_h = 8,9$ ) unter Aktivierung mittels Albumins und Kalziumchlorids. 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 Albumins.

Ausführung zu 1: Man bringt das Enzymmaterial mit Wasser auf  $10\text{ cm}^3$  in eine weithalsige Flasche mit gut eingeschliffenem Glasstopfen von  $30\text{ cm}^3$  Inhalt. Dann gibt man  $2,5\text{ g}$  Olivenöl [Verseifungszahl  $185,5^1$ ] und  $2\text{ cm}^3$  Pufferlösung ( $\text{n-NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$  im Verhältnis  $1:2$  also  $0,66\text{ cm}^3$   $\text{n-NH}_3$  +  $1,34\text{ cm}^3$   $\text{n-NH}_4\text{Cl}$ ,  $p_h = 8,9$  bei  $30^\circ$ ) und  $0,5\text{ cm}^3$  2 proz. Kalziumchloridlösung 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 Indikator dienen 12 Tropfen 1 proz. alkoholischer Lösung von Thymolphthalein, es wird mit  $0,1\text{ n}$ — $1\text{ n}$  alkoholischer Kalilauge bis zu einem deutlich blauen Farbton titriert. Dabei werden außer der gebildeten

<sup>1)</sup> Über Verseifungszahl s. S. 127.



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. (Der Alkaliwert des Puffers ist für 2 cm<sup>3</sup> Puffer 1,34 cm<sup>3</sup> n-KOH.)

Als Lipaseeinheit (L. E.) wird die Menge Lipase bezeichnet, die unter den oben charakterisierten Bedingungen (im Volumen von 13 cm<sup>3</sup>, enthaltend 2 cm<sup>3</sup> NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl Puffer von  $p_h = 8,9$ , unter Aktivierung mit 10 mg CaCl<sub>2</sub> und 15 mg Albumin) bei 30° in 1 Std. 24% von 2,5 g Olivenöl [mit einer Verseifungszahl von 185,5<sup>1)</sup>] spaltet. Das Maß für die Konzentration der Lipase ist der Lipasewert (L. W.), d. h. die Anzahl der Lipaseeinheiten in 1 Zenti-gramm der Substanz.

Ausführung zu 2. Zur Fettspaltung bei alkalischer konstanter Reaktion bedarf es großer Puffermengen, die zu Verlusten an Lipase führen kann. Das Enzym wird mit Wasser auf 10 cm<sup>3</sup> gebracht und mit 2,5 g Olivenöl versetzt. Es wird mit 5 cm<sup>3</sup> des aus (1,67 cm<sup>3</sup>) 5 n-NH<sub>3</sub> und (3,33 cm<sup>3</sup>) 5 n-NH<sub>4</sub>Cl zusammengesetzten Puffers gemischt. Dazu kommen 10 mg CaCl<sub>2</sub>, 15 mg Albumin, je 0,5 cm<sup>3</sup> Wasser, so daß die wässrige Flüssigkeit 16 cm<sup>3</sup> beträgt. Die weitere Ausführung gestaltet sich wie unter 1. beschrieben. Nur ist wegen der großen Puffermenge stärkere Lauge (1,5-n-alkohol. KOH) erforderlich.

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

Das Albumin wirkt bei saurer Reaktion hemmend; CaCl<sub>2</sub> ist ohne Wirkung.

### Bestimmungsmethode nach Knaffl-Lenz<sup>2)</sup>.

Prinzip: Die Verseifung von Estern wird gemessen durch die verbrauchte Laugenmenge, die notwendig ist, um die durch

<sup>1)</sup> Die Verseifungszahl ist definiert als die Anzahl mg KOH, die zur Neutralisation der bei vollständiger Hydrolyse von 1 g Öl auftretenden Fettsäure erforderlich ist. Die Bestimmung der Verseifungszahl erfolgt nach A. Beythien: Laboratoriumsbuch für Nahrungsmittelchemiker S. 113. Dresden und Leipzig: Steinkopf 1931. — 2 g Öl werden in ein Kölbchen pipettiert und davon 25 ccm einer 0,5-n-alkoholischen KOH gegeben. Die Flüssigkeit wird eine halbe Stunde am Rückflußkühler auf einem stark siedenden Wasserbade erhitzt. Danach titriert man noch warm die unverbrauchte KOH mit HCl zurück. (Indikator Phenolphthalein oder Alkaliblau B). Es ist gutes Jenenser Glas zu benutzen und der Titer der alkoholischen Lauge genau zu ermitteln.

<sup>2)</sup> Knaffl-Lenz: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 97, S. 242. 1923.

einen entsprechenden Indikator gekennzeichnete  $[H^+]$  konstant zu erhalten.

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 kapillar 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 kapillaren Enden in die Hälse der Röhren ragen und die Farbänderungen der mit Indikatoren 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 Kapillaren hängenden Tropfen abzuziehen. Die Röhren werden gewöhnlich mit je  $100\text{ cm}^3$  Ester (Äthylbutyrat, Propylpropionat, Mono- und Tributyrin) und einer entsprechenden Menge folgender Indikatoren versetzt: Thymolblau, Kresolrot, Phenolphthalein, Kresolpurpur, Methylrot, Bromphenolblau, und die Wasserstoffionenkonzentration einer bestimmten Farbnuance 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 Farbnuance des Indikators sich ändert, werden die Röhren zur Titration bis zur Hälfte aus dem Thermostaten gezogen und so viel karbonatfreie 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 Indikatormenge beträgt  $1\text{ cm}^3$ . Die Versuchstemperatur beträgt meistens  $30^{\circ}$ .

Bamann und Schmeller<sup>1)</sup> haben die Methode von Knaffl-Lenz etwas modifiziert, indem sie den besonders gut spaltbaren Methyl ester der Buttersäure benutzen und in reinstem,  $\text{CO}_2$ -freiem Wasser arbeiten. Dieselben Autoren haben erkannt, daß die Indikatorenmethode eine schwere Fehlerquelle enthält, wenn man

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 194, S. 1. 1931. Vgl. auch Willstätter, Kuhn, Lind und Memmen: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 167, S. 303. 1927.

nicht gleich weiter unten zu beschreibende Bedingungen einhält, da die Indikatoren die verschiedenen Esterasen z. T. außerordentlich stark hemmen können, und zwar in Abhängigkeit von Indikatorenmenge, Lösungsmittel des Indikators und dem  $p_h$  der Untersuchungsflüssigkeit. Die Autoren geben folgende Ratschläge an: Als Substratkonzentration diene am besten eine Menge von  $0,05 \text{ cm}^3 = 0,0449 \text{ g}$  Methylbutyrat in  $100 \text{ cm}^3$  Gesamtflüssigkeitsvolumen. Die Fermentmenge betrage etwa  $0,03\text{—}0,2 \text{ L-E}^1$ ). Es wird auf diese Weise ein Zusatz größerer Eiweißmenge vermieden. Für die Wahl der Indikatoren geben Bamann und Schmeller folgende Richtlinien an (l. c. und zwar S. 13): „Als Indikatoren dürfen nur diejenigen Farbstoffe verwendet werden, deren Anwesenheit auf Grund orientierender Versuche keinen, d. h. keinen meßbaren Einfluß auf den Reaktionsmechanismus ergeben haben. Sie sind in Form wässriger Lösungen (da Alkohol auf Grund von Untersuchungen von Bamann und Laeverenz auch auf die Spaltungsgeschwindigkeit einen mehr oder weniger starken Einfluß ausüben kann) und nur in Mengen, die den Farbenumschlag deutlich wahrzunehmen erlauben, zuzusetzen. Für die Bestimmung der Leberesterasen einiger Tiere haben sich als brauchbar erwiesen die Indikatoren Bromkresolpurpur und Neutralrot; von ersterem setzen wir dem Versuchsansatz von  $100 \text{ cm}^3$   $0,04 \text{ mg}$  zu und messen bei  $p_h = 6,8$ , von letzterem sind etwa  $0,3 \text{ mg}$  notwendig; als gut unterscheidbar fanden wir den Farbton bei  $p_h = 7,3$ .“

Eine Methode, die in Anlehnung an die Knaffl-Lenzsche Methodik ausgearbeitet wurde und die die genannten Einflüsse vollkommen ausschaltet, ist die

Elektrotitrimetrische Methode von P. Rona und R. Ammon<sup>2</sup>), bei der die fermentative Wirkung durch Änderung des  $p_h$  der Untersuchungsflüssigkeit (Sauerwerden durch Bildung freier Säure aus dem Ester) verfolgt wird.

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

Die Versuche werden in einem geräumigen Wasserbade (siehe Abb. 60), 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,  $11 \text{ cm}$  hohe Glaswanne,

<sup>1</sup>) Die Bedingungen für die Lipase-Einheit nach Bamann: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 62, S. 1538. 1929, und zwar S. 1541.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 181, S. 49. 1927.

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  $120 \text{ cm}^3$  fassendes und  $12 \text{ cm}$  hohes Standglas, das mit der Versuchslösung gefüllt ist. In diese Flüssigkeit wird  $0,5 \text{ cm}$  tief eine Glockenelektrode (Kathode) eingesetzt. Durch

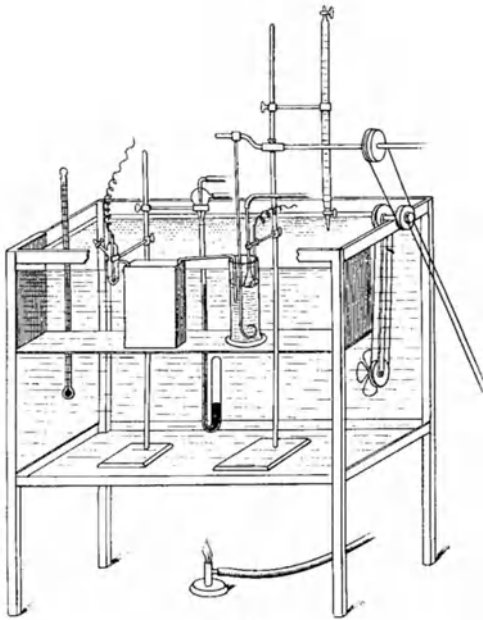


Abb. 60.

einen Agarheber von dem Standglase zum KCl-Bade sind beide Elektroden miteinander verbunden. Die Ableitungsdrähte der Elektroden gehen entweder an die Gasketten-Apparatur nach L. Michaelis mit dem Kapillarelektrometer oder an das Potentiometer nach E. Mislowitzer oder an das Röhrenvoltmeter (vgl. S. 94). Um eine gute Durchmischung der Untersuchungsflüssigkeit zu gewährleisten, ist noch ein Rührer angebracht, der durch eine besondere Konstruktion mit dem Rührwerk des Wasserbades in Verbindung

gesetzt ist. Durch die Glockenelektrode geht beständig Wasserstoffgas, um jederzeit während der Versuchsdauer  $p_h$ -Messungen ausführen zu können. Werden kleinere Standgefäße mit kleinen Glockenelektroden benutzt, so können gleichzeitig zwei Versuche in Gang gehalten werden. Hinter dem Wasserbad, und zwar in Höhe der Untersuchungsflüssigkeit, ist noch eine 2 Volt-Birne angebracht, die zum Leuchten gebracht wird, wenn die Ausgangsflüssigkeit etwas getrübt ist (Preßsaft oder Esteremulsion) und es gilt, zu sehen, ob und wie tief der Platindraht der Elektrode eintaucht.

Beispiel: In das Standglas, das sich in dem auf  $37^0$  angeheizten Wasserbade befindet, werden  $4 \text{ cm}^3$  Schweine-Leber-Preßsaft und  $96 \text{ cm}^3$  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 platierte Platinelektrode hat sich mit Wasserstoff beladen. Durch einen Agarheber wird der Stromkreis geschlossen. Die  $p_h$ -Messung erfolgt unter beständigem Wasserstoffstrom, wobei der Rührer auf Leerlauf gestellt werden kann, was aber nicht nötig ist. Es hat sich erwiesen, daß das Potential sich schneller einstellt, wenn man bei strömenden Wasserstoff mißt. Bei sehr langdauernden Versuchen kann man dann nach der Messung den  $H_2$ -Strom unterbrechen (am besten am Hahn der Glockenelektrode) und etwa 1 Minute vor jeder Messung wieder anstellen. 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. Zu der so neutralen Lösung werden 0,2827 g von Mandelsäuremethylester<sup>1)</sup>, in 1 cm<sup>3</sup> Toluol gelöst, gefügt. (Die Esterzugabe kann auch direkt erfolgen). 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 Std. 3,4 cm<sup>3</sup>, nach 2 Std., nachdem die Lösung wieder 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 g 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 Rizinuslipase nach Willstätter-Waldschmidt-Leitz<sup>2)</sup>.

In ein kleines zylindrisches Standfläschchen mit eingeschlif-fenem Stopfen 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. Das Öl wird pipettiert, und zwar

<sup>1)</sup> Darstellung von Mandelsäuremethylester siehe S. 143.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chemie Bd. 134. S. 161. 1924.

leicht man sich eine Meßpipette, indem man auswägt, wieviel  $\text{cm}^3$  Öl 2,5 g entsprechen. Zu der auf  $20^\circ$  gehaltenen Mischung werden alsdann  $2,00 \text{ cm}^3$  0,5-n-Azetatpufferlösung von  $p_h$  4,7 (bestehend aus  $1,00 \text{ cm}^3$  0,5-n-Essigsäure +  $1,00 \text{ cm}^3$  0,5-n-Ammonazetat) zugegeben, worauf das Fläschchen 3 Minuten lang kräftig mit der Hand geschüttelt wird, dann läßt man es noch 17 Minuten im Thermostaten von  $20^\circ$  stehen. Der Inhalt des Fläschchens wird durch Zusatz von  $30 \text{ cm}^3$  96prozentigem Alkohol in einen  $250 \text{ cm}^3$ -Erlenmeyerkolben übergespült (Alkoholspritzflasche!), so die Fermentwirkung unterbrochen und die gebildete Fettsäure nach Zusatz von  $15 \text{ cm}^3$  Äther mit n-KOH und Phenolphthalein als Indikator titriert. Bei Spaltung des alkohollöslichen Rizinusöls erübrigt sich der Zusatz von Äther. Da sowohl der angewandte Puffer als auch die amphotere Substanz der Enzympräparate in alkoholischer Lösung einen Eigenverbrauch an Lauge aufweisen, muß dieser Betrag in einer Leerbestimmung ermittelt werden.

Als Maß für die Rizinuslipase 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 zu  $7,5^0/0$  spaltet.

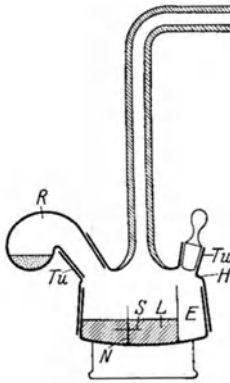


Abb. 61. L Ringerlösung oder Serumverdünnung, N Glasnadel, S Gewebsschnitt, E Einsatz für Atmungsversuche, H Helm des Manometers, Tu Tubus, R Retorte.

### Gasanalytische Bestimmung der Esterasewirkung<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die Methode erlaubt, sehr geringe Lipasemengen zu bestimmen und auch, das Ferment im überlebenden Gewebe nachzuweisen. In Anlehnung an die Warburg'sche Methode des Glykolyse nachweises wird die bei der Verseifung von Estern (z. B. Tributyrin) gebildete Säure (z. B. Buttersäure) dadurch gemessen, daß man das Volumen einer durch die Säure ausgetriebenen äquivalenten Menge  $\text{CO}_2$  manometrisch bestimmt.

Apparatur: Zur Messung der  $\text{CO}_2$  dienen Barcroft'sche Blutgasmanometer in der Warburg'schen Modifikation, die auf einer Schüttelvorrichtung montiert sind (Tourenzahl 60—120 pro Minute). Als Reaktionsgefäße dienen Glaströge von ca.  $10 \text{ cm}^3$

<sup>1)</sup> Rona und Lasnitzki: Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 504. 1924.

Inhalt (Abb. 61 und 62). Ein kleiner abgetrennter Glasraum kann zur Aufnahme evtl. Absorptionsflüssigkeit (für Atmungsversuche angebracht werden). Der Glastrog wird mittels eines Schliffes an dem Helm des Manometers befestigt. Sehr gut bewährt sich die von Nicolai angegebene Form (Abb. 63) des Reaktionsgefäßes. Als Manometersperrflüssigkeit dient die Brodiesche Flüssigkeit. Sie besteht aus 500 cm<sup>3</sup> Wasser, 23 g NaCl, 5 g gallensaurem Natron und ist zur Abhaltung von Bakterien mit so viel alkoholischer Thymolösung versetzt, daß sie deutlich nach Thymol riecht. Wenn man die Brodielösung besser sichtbar machen will, so gibt man am besten Indigokarmin oder auch Fluoreszein hinzu. Die Manometer enden unten in einem Gummischlauch mit Druckschraube.

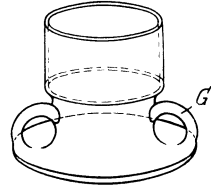


Abb. 62.

#### Eichung der Gefäße.

Die Gefäße und der Stopfen werden einen Tag mit Kaliumbichromat-schwefelsäure gereinigt, mit Leitungswasser und danach mit destilliertem Wasser gut gespült und im Trockenschrank bei 100<sup>0</sup> getrocknet. In den

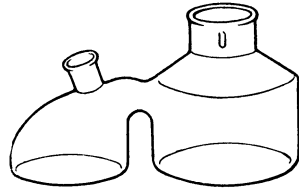


Abb. 63.

Schlauchansatz am unteren Ende des Barometers wird durch den oben offenen linken Barometerschenkel unter mehrfachem Vor- und Zurückdrehen des Schlauchquetschers Brodielösung eingefüllt, deren spezifisches Gewicht so beschaffen ist, daß 10000 mm Flüssigkeitssäule 760 mm Hg entsprechen. Man kann auch den mit Brodielösung gefüllten Schlauchansatz über das untere Ende des Manometers ziehen und dann mit Draht und Kollodium gut an dem Manometer befestigen. So gelangen weniger Luftblasen in das Manometer. Vor der Eichung überzeugt man sich, daß beim Hochdrücken der Flüssigkeit in die Kapillaren keine Luftblasen in die Kapillaren hineingelangen und auch die beiden Menisken blasenfrei sind.

Die getrockneten Gefäße werden an ihren Schliffflächen mäßig eingefettet, mit Gummischnören oder besser mit kräftigen Spiralfedern an den Konus oder die Haube des Manometers angesetzt und mit dem 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 Hineindrehen 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 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 Versuches ein Substrat oder ein Gift hinzugefügt werden soll, Gefäße wie Abb. 63 und 89 zu benutzen, da in manchen Fällen beim Umdrehen einer besonders ungünstigen Retorte eine scheinbare Gasbildung bis zu 30 mm vorgetäuscht wird. Es hat sich auch gezeigt, daß die Größe der Schlißfläche die Fehlergrenze erheblich verstärken kann. Es ist also ratsam, möglich kleine Schlißflächen anzuwenden.

Die Eichung der Gefäße 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 unbekanntes 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:

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

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

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. Die Temperaturschwankungen dürfen nicht über  $1^\circ$ , die Barometerschwankungen nicht über 5 mm Hg betragen.  $v_0$  ist bei der Eichmarke  $M$  gemessen worden und gibt infolgedessen den Inhalt des Gesamttraumes von  $M$  ab wieder. Da der Durchmesser der Kapillare bekannt ist und mit 1,2 mm angeschlagen werden kann, so muß das kleine Volumen des Zylinders von der Eichmarke  $M$  bis zur Marke 15, der Nullmarke, bei der man alle Messungen



praktisch ausführt, in Abzug gebracht werden und zwar nach der Formel  $v_A = \pi r^2 h$ . Bei  $h = 10$  cm ist  $v_A = 3,14 \cdot 0,0036 \cdot 10$  cm<sup>3</sup> = 0,113 cm<sup>3</sup>, wobei  $r$ , der Radius der Kapillare, mit 0,6 mm veranschlagt ist.

Vor Beginn der Eichung und vor jeder neuen Einstellung warte man mindestens eine halbe, am besten eine Stunde bei völlig heruntergedrehten Menisken, bis die Kapillaren abgelaufen sind, stelle dann durch vorsichtiges Anschrauben den rechten Meniskus mit seinem unteren Rand auf den Anfangsteil der Skala (0,0) 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 Kapillare, was ohne Einfluß auf die Eichung bleibt, ferner bei Anwesenheit von Wasser im Gefäß eine verzögerte Einstellung des Gleichgewichtes:

Partialdruck des Gases im Gasraum  
Gaslösung 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, auswägt und unter Berücksichtigung des spezifischen Gewichtes des Hg bei der Eichtemperatur sein Volumen bei dieser Temperatur errechnet,

Quecksilber.

Temperatur Grad	Spezifisches Gewicht	1:Spezifisches Gewicht
15	13,5584	0,073 754
16	13,5560	0,073 768
17	13,5535	0,073 782
18	13,5511	0,073 795
19	13,5486	0,073 808
20	13,5461	0,073 822
21	13,5437	0,073 835
22	13,5412	0,073 849
23	13,5388	0,073 862
24	13,5363	0,073 875
25	13,5339	0,073 889
26	13,5314	0,073 902

was zugleich den Vorteil einer genaueren Bestimmung von  $a$  hat.

Zur Berechnung des Hg-Volumens aus dem Hg-Gewicht diene nebenstehende Tabelle.

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

Die Größe  $h_2 - h_1$  kann ohne weiteres durch Subtraktion der entsprechenden beiden, am offenen (linken) Manometerschenkel abgelesenen Werte erhalten werden, dagegen berechnet sich  $h_2$  allein als Differenz der Standpunkte der Menisken in dem offenen (linken) und dem nach der Außenluft geschlossenen (rechten) Manometerschenkel.

Beispiel einer Ermittlung von  $v$ . Temperatur des Wasserbades  $t = 25,4^\circ \text{C}$ . Eichmarke  $M = 5,0$ ,  $h_1 = 11,93$  cm,  $h_2 = 21,43$  cm, nach Abzug der Eichmarke  $h_2 = 16,43$ .  $h_2 - h_1 = 9,50$  cm.  $g \text{ Hg} = 60,92$  g, d. h.  $a = 4,49$  cm<sup>3</sup>.

$$v_{0,5} = a \frac{h_2}{h_2 - h_1} = 4,49 \cdot \frac{16,43}{9,50} = 7,760 \text{ cm}^3,$$

$$v_A = 0,113 \text{ cm}^3 \text{ (vgl. S. 135),}$$

$$v_{0,5} = 7,647 \text{ cm}^3.$$

#### Die Untersuchungstechnik.

Prinzip: In einem abgeschlossenen, mit Manometer versehenen System von dem Volumen  $v$  bei der Temperatur  $T$  und dem Druck  $P$  entstehe oder verschwinde ein unbekanntes Gasvolumen  $v_u$ . Die dabei auftretende Druckänderung, bei konstant gehaltenem Volumen, sei  $h$ . Es besteht dann folgende Beziehung:

$$(v + v_u)P = (P + h) \cdot v,$$

daraus

$$v_u = \frac{v(P + h) - Pv}{P} = \frac{hv}{P}. \quad (1)$$

Bei Reduktion aller Werte auf Normalbedingungen (Temperatur  $273^\circ$  abs. und Barometerdruck  $P_0 = 760$  mm Hg) besteht folgende Beziehung:

$$v_x = v_u \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{P}{P_0}.$$

Setzt man für  $v_u$  den gefundenen Wert aus (1) ein, so erhält man

$$\pm v_x = \pm h \frac{v}{P_0} \cdot \frac{273}{T}. \quad (2)$$

In dem bekannten Raum  $v$  befinde sich eine Flüssigkeitsmenge  $v_F$ . Der restliche Gasraum betrage  $v_G$ , d. h.

$$v = v_F + v_G. \quad (3)$$

Die in der Flüssigkeit (bei einem Partialdruck von 760 mm Hg, also  $P_0$ ) gelöste Gasmenge beträgt dann auf Normalbedingungen reduziert  $v_F \alpha$ , wobei  $\alpha$  der Bunsensche Absorptionskoeffizient für das im Versuch entstehende oder verschwindende Gas<sup>1)</sup> und die verwendete Flüssigkeit ist.

Ist  $h$  die beobachtete Druckänderung, so hat sich also die in der Flüssigkeit gelöste Gasmenge um  $h \cdot \frac{v_F \alpha}{P_0}$  geändert. Dieser Wert muß zu dem in Gleichung (2) bestimmten Wert hinzugeaddiert werden, so daß man schließlich als Gesamtänderung erhält

$$\pm v_x = \pm h \frac{v_F \alpha + v_G \frac{273}{T}}{P_0}. \quad (4)$$

Ist die Sperrflüssigkeit des Manometers Brodiesche Lösung, so wird  $P_0 = 10000$  mm. Man kommt zu dem Ausdruck

$$\pm v_x = \pm h \left[ \frac{v_F \alpha + v_G \frac{273}{T}}{10000} \right]. \quad (5)^2$$

Der in der Klammer stehende Bruch stellt die Gefäßkonstante  $K$  für das betreffende Gas dar.

Es ist also

$$\pm v_x = \pm h \cdot K, \quad (6)$$

d. h. die entstandene oder verschwundene Gasmenge in mm<sup>3</sup> ist gleich dem Produkt aus der Gefäßkonstanten und der Druckzu- oder -abnahme in mm Brodie, sofern die Werte für  $v_F$  und  $v_G$  ebenfalls in mm<sup>3</sup> eingesetzt sind.

<sup>1)</sup> Absorptionskoeffizient  $\alpha$  in Wasser

für Sauerstoff bei 18° 0,0322, bei 25° 0,0283, bei 37,5° 0,0237,  
für CO<sub>2</sub> „ 18° 0,928, „ 25° 0,759, „ 37,5° 0,561.

<sup>2)</sup> Benutzt man aus bestimmten Gründen (genauere Ermittlung sehr kleiner Gasmengen) eine Sperrflüssigkeit von anderem spezifischen Gewicht, so ist der Nenner des Bruches mit  $S_B/S$  zu multiplizieren, wo  $S_B$  das spezifische Gewicht der Brodielösung,  $S$  das spezifische Gewicht der Sperrflüssigkeit bedeutet. S. auch Rona und Fabisch: Biochem. Zeitschr. Bd. 227, S. 205. 1930.

Gleichung (1) gilt für jedes beliebige  $P$ , da dieser Wert sich bei der Subtraktion, durch die man zu Gleichung (2) gelangt, immer heraushebt. Die Gefäßkonstante  $K$  gilt also für jeden in dem System herrschenden Druck, ist daher unabhängig von dem Atmosphärendruck und unabhängig von der Höhendifferenz der Menisken in beiden Schenkeln des Manometers.

Die Konstante setzt voraus, daß bei Änderung der Gasmassen 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.

*Beispiel einer K-Berechnung:*

$v_{0,5} = 7647 \text{ mm}^3$ ,  $v_F = 2000 \text{ mm}^3$ ,  $v_g = 5647 \text{ mm}^3$ . Versuchstemperatur betrage  $25,8^\circ = 298,8^\circ (T)$ , d. f.  $v_g \cdot \frac{273}{T} = 5160 \text{ mm}^3$ .  $\alpha_{\text{CO}_2}^{25,8} = 0,742$  d. f.  $v_F \cdot \alpha = 1484 \text{ mm}^3$ , mithin ist  $v_F \cdot \alpha + v_g \frac{273}{T} = 6644 \text{ mm}^3$ , d. f.  $K = 0,664$ . Hier ist zu bemerken, daß zur Berechnung der entstehenden oder verschwindenden Gasmenge nach  $v_x = \pm h \cdot K$   $h$  in mm auszudrücken ist und daß  $v_x$  dann in  $\text{mm}^3$  erhalten wird.

Für atmosphärische Druckänderungen im Laufe eines Versuches müßte eine Korrektur angebracht werden, da dann die Bedingungen der Gleichung (1) nicht gelten, weil die Werte  $P$  der beiden Summanden nicht mehr gleich sind. Doch erübrigt sich das bei Anwendung eines Thermobarometers, da man an diesem die notwendige Korrektur direkt in mm Brodie ablesen und die beobachteten Druckänderungen an den Versuchsgefäßen einrechnen kann.

Thermobarometer: Die während eines Versuches unvermeidlich auftretenden Schwankungen des Luftdruckes und der Temperatur würden das Ablesungsergebnis erheblich verfälschen und müssen deshalb durch eine geeignete Korrektur beseitigt werden. Man benutzt hierzu ein Gefäß (Thermobarometer), in dem weder eine Gasentwicklung noch eine Gasaufnahme stattfindet; alle hier auftretenden Druckschwankungen können nur auf Änderungen des Luftdruckes und der Temperatur beruhen. Eine einfache Überlegung ergibt, daß Luftdruckschwankungen in allen Gefäßen die Manometerflüssigkeit um die gleiche Anzahl von mm heben oder senken. Auch die durch Temperaturschwankungen

hervorgerufenen Druckänderungen werden bei den gewöhnlichen kleinen Verschiedenheiten des Anfangsdruckes in den verschiedenen Gefäßen praktisch gleich sein. Es folgt daher, daß Luftdruck- und Temperaturschwankungen in allen Manometern die Manometerflüssigkeit um die gleiche Strecke verschieben. Zur Korrektur der Ablesung ist es also nur notwendig, die Schwankung des Thermobarometers in mm Brodie mit umgekehrtem Vorzeichen zu den Ablesungen der eigentlichen Versuchsmanometer zu addieren.

Leerversuch: Von dem Gebrauch des Thermobarometers ist zu unterscheiden der des Leerversuches. Dieser ist in all den Fällen notwendig, wo neben dem eigentlich zu untersuchenden Prozeß ein anderer einhergeht, der ebenfalls mit einer Gasentwicklung oder -aufnahme verbunden ist (Atmung, Autolyse usw.). In einem Gefäß wird dieser allein gemessen und die entwickelte Gasmenge nach der Formel  $h$  mal Gefäßkonstante bestimmt.

Beispiel: Bestimmung einer Reaktion, bei der gleichzeitige autolytische Veränderungen das Ergebnis verschleiern würden.

$T.B.$  = Thermobarometer.  $L$  = Leerversuch (Autolyse)  $K = 0,6$ .

$V$  = Hauptversuch (Autolyse + Hauptreaktion)  $K = 0,5$ .

Zeit	$T.B.$	$L$ $K = 0,6$	$V$ $K = 0,5$
	cm Brodie	cm Brodie	cm Brodie
0	20,2	18,3	28,1
1 Std.	20,6 + 0,4	20,7 + 2,4	23,9 - 4,2
2 „	20,5 + 0,3	22,6 + 4,3	19,2 - 8,9
Nach Korrektur mit Hilfe des Thermobarometers			
0		18,3	28,1
1 Std.		20,3 + 2,0	23,5 - 4,6
2 „		22,3 + 4,0	18,9 - 9,2

Im Hauptversuch (Autolyse + Hauptreaktion) ist eine Druckabnahme von 46 mm entsprechend einer Gasaufnahme von  $46 \cdot 0,5 = 23 \text{ mm}^3$  pro Stunde zu beobachten; im Leerversuch eine Druckzunahme von 20 mm entsprechend einer Gasproduktion von  $20 \cdot 0,6 = 12 \text{ mm}^3$  pro Stunde. Daraus ist zu schließen, daß die Autolyse den Effekt des Hauptprozesses zum Teil aufhebt; dieser verläuft also ohne diese Störung mit einer Gasaufnahme von  $23 + 12 = 35 \text{ mm}^3$  pro Stunde.

Spaltung von Tributyrin durch Meerschweinchen-serum-Esterase. Die Verfolgung der fermentativen Tributyrinhydrolyse kann in dem Trog nach Abb. 61 und 63 ausgeführt werden. Der kleine Anhang in dem Trog nach Abb. 63, eine Anordnung von Nicolai, hat den Zweck, Substrat- und Fermentlösung getrennt einzufüllen, um die Spaltung des Esters nach

Durchmischen in der geschlossenen Apparatur gleich von Anfang an verfolgen zu können. Nähere Beschreibung dieser Technik siehe weiter unten (S. 141). In dem anhangslosen Trog geht die Hydrolyse des Esters gleich nach dem gemeinsamen Einfüllen der Tributyrin-emulsion und Fermentlösung vonstatten. Man kann diesen Trog nur dann benutzen, wenn der Spaltungsverlauf durch eine Gerade gekennzeichnet ist. Es wird dann aus der Geraden gewissermaßen ein Stück herausgegriffen.

Die Ausführung einer Verfolgung einer Tributyrinhydrolyse durch Meerschweinchenserumesterase verläuft folgendermaßen: Als Substrat dient eine 10proz. Tributyrinemulsion in  $R_{(20)}$  ( $R_{(20)}$ :  $100 \text{ cm}^3$   $9\frac{0}{100}$  NaCl- +  $2 \text{ cm}^3$   $1,2$  KCl- +  $2 \text{ cm}^3$   $1,76\frac{0}{100}$   $\text{CaCl}_2$  [krist.] +  $20 \text{ cm}^3$   $1,26\frac{0}{100}$   $\text{NaHCO}_3$ -Lösung),

als Fermentlösung eine Serum-Verdünnung 1 : 10 bis 1 : 500 in  $R_{(20)}$ .

Die Temperatur des Wasserbades betrage  $37,5^0$ . Das Gasgemisch, mit dem  $R_{(20)}$  zu sättigen ist und mit dem  $v_g$  gefüllt sein soll, hat die Zusammensetzung  $95\frac{0}{100}$   $\text{N}_2$  +  $5\frac{0}{100}$   $\text{CO}_2$ .  $v_f$  betrage  $3 \text{ cm}^3$ , und zwar soll sich  $v_f$  zusammensetzen aus  $2,7 \text{ cm}^3$  Serumverdünnung bzw.  $R_{(20)}$  und  $0,3 \text{ cm}^3$  Substratemulsion bzw.  $R_{(20)}$  bei den Kontroll-Versuchen.

Man fülle in je 2 Tröge nacheinander folgende Lösungen ein:

Trog 1 und 2:	Trog 3 und 4
$2,7 \text{ cm}^3$ Fermentlösung	$2,7 \text{ cm}^3$ $R_{(20)}$
+ $0,3 \text{ cm}^3$ Substratemuls.	$0,3 \text{ cm}^3$ Substratemuls.
Trog 5	Trog 6
$2,7 \text{ cm}^3$ Fermentlösung	Ohne Füllung:
$0,3 \text{ cm}^3$ $R_{(20)}$	Thermobarom.

Trog 1 und 2 geben in Doppelversuchen die fermentative Hydrolyse wieder, die aber noch die sogenannte Eigenverseifung des Esters enthalten kann und die durch die Versuchsansätze in Trog 3 und 4 kontrolliert wird. Die Werte der Eigenhydrolyse, in  $\text{mm}^3$   $\text{CO}_2$  ausgedrückt, sind dann von den Werten, die aus Trog 1 und 2 erhalten werden, in Abzug zu bringen. Bei Tributyrin ist die Eigenverseifung auch unter den gewählten Bedingungen sehr klein und oft zu vernachlässigen, bei Anwendung von z. B. Monobutyryn oder Mandelsäuremethylester dagegen nicht (s. auch Tab. S. 142). Nachdem die Tröge an die korrespondierenden Helme der Manometer gebunden sind, und zwar am besten mit Hilfe von nicht rostenden Stahlspiralen, wird das Gasgemisch eingeleitet (3 Min.).

Das Gas tritt an dem rechten Schenkel des Manometers ein (dem mit Hahn versehenen) und an dem Tubus des Helms wieder

aus. — Nun werden die Apparate ins Wasserbad gesetzt und zwecks Temperaturengleichs etwa 10 Minuten geschüttelt. Die Bewegung hat bei nicht zu großer Amplitude 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 Manometerschenkel 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 Temperaturengleich beendet. Die Einstellung auf die Nullmarke und Ablesungen des Manometerstandes wird sofort im Anschluß daran vorgenommen. Die graphische Darstellung (Abb. 64), wobei die Zeit auf der Abszisse und die Buttersäurewerte in Mikromol auf der Ordinate abgetragen sind, gibt die Spaltung wieder und zeigt, daß die Spaltung nullmolekular verläuft.

Bei Anwendung des Nicolaitroges befindet sich die kleinere Flüssigkeitsmenge in dem Anhang, also bei unserm Beispiel die  $0,3 \text{ cm}^3$  der Esteremulsion und die  $2,7 \text{ cm}^3$  der Fermentverdünnung in dem großen Hauptteil des Troges. Das Gaseinleiten und Einsetzen erfolgt genau so wie bei den anderen Trögen. Nach Einstellung des Temperaturengleichgewichts, das dadurch kontrolliert werden kann, ob nach Einstellung der Brodieflüssigkeit auf die Nullmarke, also  $M = 15$ , keine oder nur eine geringe, durch die Eigenhydrolyse des Esters bedingte Volumenänderung stattfindet, kann man zur Mischung von Substrat und Ferment schreiten, wobei sehr genau darauf zu achten ist, daß dabei nicht von der Flüssigkeit in die Kapillare gelangt. Man liest den Stand der Brodieflüssigkeit im linken Schenkel des Manometers ab — bei  $M = 15$  im rechten Schenkel. Jetzt wird die Öffnung des oberen Endes des linken Schenkel mit dem Zeigefinger der rechten Hand verschlossen und das ganze Manometer mit der rechten Hand und Unterstützung mit der linken Hand aus dem Wasserbade herausgenommen. Nun bringe man durch vorsichtiges

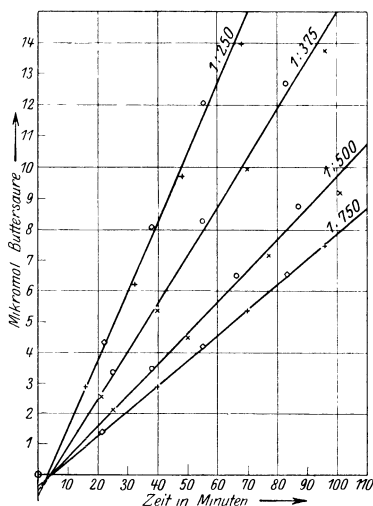


Abb. 64.

Neigen und Bewegen des Manometers den Inhalt des großen und kleinen Teil des Troges in Verbindung und mische die Flüssigkeiten gründlich durch, wobei man mit der linken Hand den Trog fest gegen den Helm preßt. Danach setze man das Manometer wieder ins Wasserbad zurück. Man lese gleich nach dem Einsetzen die Zeit ab und betrachte diesen Zeitwert als  $t = 0$ . Nach 5 Min. kann die erste Ablesung gemacht werden, nachdem der rechte Schenkel auf  $M = 15$  gestellt ist.

*Spaltung des raz. Mandelsäuremethylesters durch Taka-Esterase<sup>1)</sup>.*

Statt des Tributyrins und der Meerschweinchenserumesterase kann man z. B. die Spaltung des Mandelsäuremethylesters durch Taka-Esterase verfolgen. Hier nehme man eine  $R_{(10)}$ -Lösung, d. h. jetzt  $10 \text{ cm}^3$  der 1,26proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung auf  $104 \text{ cm}^3$  des isotonischen  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ -Gemischs, und arbeite man bei niedrigerer Temperatur. Die geringere Alkalität und niedrigere Temperatur bewirken eine Herabsetzung der Eigenhydrolyse des Esters. Die folgende Tabelle gibt einen solchen Versuch wieder.

Zeit Min.	Apparat 1 Thermobarometer $1,5 \text{ cm}^3 R_{(10)}$ cm Brodie		Apparat 2; $K = 0,52$ Ferment- und Eigenhydrolyse des Esters, $0,5 \text{ cm}^3$ Fermentemulsion + $1,0 \text{ cm}^3$ Esterlösung				Apparat 7; $K = 0,57$ Eigenhydrolyse des Esters $0,5 \text{ cm}^3 R_{(10)}$ + $1,0 \text{ cm}^3$ Esterlösung				
			cm Brodie	mm Brodie nach Thermo- barom.- Kontrolle	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> ohne   mit Ester- hydrolyse- abzug	cm Brodie	mm Brodie nach Thermo- barom.- Kontrolle	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>			
0	11,10	—	6,30	—	—	—	7,0	—	—	—	
5	10,90	(-) 0,20	6,45	0,15	3,5	1,82	0,96	6,95	(-) 0,05	1,5	0,86
10	10,80	(-) 0,30	6,70	0,40	7,0	3,64	3,35	6,75	(-) 0,25	0,5	0,29
15	10,60	(-) 0,50	6,75	0,45	9,5	4,94	3,23	6,80	(-) 0,20	3,0	1,71
25	10,50	(-) 0,60	7,40	1,10	17,0	8,85	6,00	6,90	(-) 0,10	5,0	2,85
35	10,35	(-) 0,75	8,00	1,70	24,5	12,70	9,00	6,90	(-) 0,10	6,5	3,70
45	10,90	(-) 0,20	9,30	3,00	32,0	16,65	11,52	7,70	0,70	9,0	5,13
55	11,30	(+) 0,20	10,40	4,10	39,0	20,30	14,60	8,20	1,20	10,0	5,70

Erforderliche Lösungen:

a) dl-Mandelsäuremethylester (s. u.), 1,5proz. Lösung in  $R_{(10)}$  (s. oben), von der im Versuch  $1,0 \text{ cm}^3$  angewandt werden.

b) Taka-Esterase, enthalten in dem käuflichen Präparat „Taka-Diastase“ von Parke und Davis, London (zu beziehen durch Simons-Apotheke, Berlin C). 7proz. Aufschwemmung in  $R_{(10)}$ , von der  $0,5 \text{ cm}^3$  benutzt werden.

<sup>1)</sup> Nach Versuchen von Rona, Ammon und Werner in Biochem. Zeitschr. Bd. 217, S. 42. 1930.



c)  $R_{(10)}$ , gesättigt mit dem Gasgemisch 95%  $N_2$ , 5%  $CO_2$ ; Wasserbadtemperatur 26,5°;  $v_F$  beträgt also 1,5  $cm^3$ .

Der razemische Mandelsäuremethylester wird folgendermaßen hergestellt<sup>1)</sup>. 25 g Mandelsäure werden mit 80 g HCl-haltigem Methylalkohol versetzt und an einem Rückflußkühler 4—5 Stunden gekocht. Der H-Cl-Gehalt des Methylalkohols, der vorher über gebranntem Kalk destilliert worden ist, beträgt etwa 10%. Das HCl-Gas, aus festem NaCl und konz.  $H_2SO_4$  hergestellt, wird in einer mit konz.  $H_2SO_4$  gefüllten Waschflasche getrocknet und in den gekühlten Alkohol eingeleitet. In dem Reaktionsgemisch wird dann der größte Teil des überschüssigen Alkohols durch Destillation entfernt. Der Rückstand wird in die dreifache Menge Wasser gegossen. Die Flüssigkeit wird dann mit gesättigter  $Na_2CO_3$ -Lösung neutralisiert und mehrmals mit Äther extrahiert. Nach dem Abdampfen des Äthers hinterbleibt der Ester als Öl, das bald zu einer weißen Kristallmasse erstarrt. Der Rohester wird dann zweimal aus einem Gemisch von Ligroin und Benzol (wenig) umkristallisiert. Weiße Nadeln, Schmelzpunkt 52,5°.

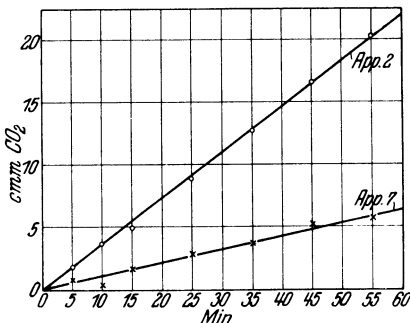


Abb. 65.

Die Ausführung, d. h. Füllung usw. erfolgt in der bereits beschriebenen Weise.

### Fermentative Esterifizierung<sup>2)</sup>.

Da die Gleichgewichte chemischer Prozesse durch Fermente nicht verschoben werden, so ist zu erwarten, daß nicht nur Spaltungen, sondern auch Synthesen durch Fermente unter geeigneten Bedingungen katalysiert werden.

Als Beispiel einer solchen katalysierten Synthese soll die Bildung von n-Buttersäure-isoamylester durch Schweinepankreas-esterase beschrieben werden, wobei die erfolgte Esterbildung durch die Abnahme des Säuregehaltes festgestellt wird.

Man pipettiere in ein kleines Fläschchen von etwa 60  $cm^3$  Inhalt 2,30  $cm^3$  konz. norm. Buttersäure, 1,5  $cm^3$  Wasser und 46,2  $cm^3$  Isoamylalkohol. Dazu gebe man 0,25 g Schweinepankreas-trockenpulver, das nach den Angaben auf S. 278 hergestellt ist. Die Gesamtmolarität der Buttersäure beträgt etwa 0,5 m, die Fermentkonzentration 0,5% und der Wasserzusatz 3%. Die

<sup>1)</sup> S. auch Rona und Ammon: Biochem. Zeitschr. Bd. 181, S. 49. 1927.

<sup>2)</sup> Rona, Ammon u. Werner: Biochem. Zeitschr. Bd. 221, S. 381. 1930. Vgl. hierzu Bodenstein u. Dietz: Zeitschr. f. Elektrochem. Bd. 12, S. 605. 1906 und Dietz: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 52, S. 279. 1907.

Flasche wird mit einem ausgekochten Gummistopfen verschlossen und der Inhalt etwa 3 Min. geschüttelt. Etwa 7 cm<sup>3</sup> der Untersuchungsflüssigkeit werden zentrifugiert. Zu derselben Zeit wird das Fläschchen in eine in einem Brutschrank von 37° befindliche Schüttelapparatur gesetzt. Von Zeit zu Zeit (etwa 3—5 Stunden) werden aus dem Fläschchen weitere Entnahmen von etwa je 7 cm<sup>3</sup> gemacht, die auch zentrifugiert werden. Von den klaren Zentrifugaten werden je 5 cm<sup>3</sup> abpipettiert, die nach Zusatz von 20 cm<sup>3</sup> absol. Alkohol und einigen Tropfen einer Bromthymolblaulösung

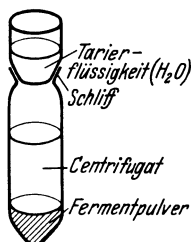


Abb. 66.

mit 0,1 n-NaOH titriert werden. Nach 20 Stunden sind etwa 50—75% der ursprünglich vorhandenen Buttersäuremenge verestert. Die Esterbildung macht sich auch noch durch den angenehmen Geruch des Esters bemerkbar. Es ist dann ein analoger Ansatz, nur jetzt ohne Fermentpulver, anzusetzen. Diese Eigenveresterung ist jedoch sehr gering. Das Zentrifugieren der Entnahmen erfolgt zweckmäßig in Zentrifugiergläsern, die durch einen Schliffaufsatz verschließbar sind und geschlossen tariert werden können<sup>1)</sup>.

Die Gläser haben vorstehende Form (s. Abb. 66, Hersteller Hanff und Buest, Berlin N.).

## Andere Esterasen.

### Phosphatasen.

Phosphatasen katalysieren die Hydrolyse von aliphatischen und aromatischen Orthophosphorsäureester<sup>2)</sup>. Auch die Ester der Pyrophosphorsäure werden von der Phosphatase gespalten. Die Dephosphorylierung der Hexosediphosphorsäure erfolgt in Stufen unter Bildung einer Hexosemonophosphorsäure.

Die Darstellung eines Trockenpräparates erfolgt nach Erdtman folgendermaßen<sup>3)</sup>: 1 kg Schweineiere wurde gemahlen, mit 1 l dest. Wasser und reichlich Toluol gemischt. Diese Masse wird bei 30—40° einer 24—48stündigen Autolyse unterworfen. Dann wurde gesiebt, die trübe Flüssigkeit mit der doppelten Menge Alkohol gefällt und abzentrifugiert. Die Fällung wurde mit

<sup>1)</sup> Vgl. Rona, Ammon u. Fischgold: Biochem. Zeitschr. im Druck.

<sup>2)</sup> Vgl. Neuberg u. Jacobsohn: Biochem. Zeitschr. Bd. 199, S. 498. 1928. Nach J. Roche (Bull. de la soc. de chimie. biol. Bd. 13, S. 841. 1931) muß zwischen den Phosphatasen der roten Blutkörperchen einerseits und den Phosphatasen der weißen Blutkörperchen, des Serums, der Niere und des Darmtrakts andererseits unterschieden werden. Vielleicht stellt die Phosphatase der Knochen einen 3. Typ dar.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 172, S. 182. 1927.

Alkohol verrührt und filtriert; diese Operation wird 2—3 mal wiederholt. Dann wird das Pulver mit  $\frac{1}{2}$  l Äther gewaschen, in dünner Schicht ausgebreitet, eine Nacht getrocknet. Ausbeute rund 25 g. Das Pulver wird im Vakuum aufbewahrt.

Nach Forrai<sup>1)</sup> werden die vom Bindegewebe befreiten Organe fein zerhackt, durch ein Sieb getrieben, der Brei auf Glasplatten vorsichtig (nicht über 40°) getrocknet. Das von der Glasplatte abgeschabte Material wird im Mörser fein zerrieben. Das Organpulver hält sich in gut verschlossenen Gläsern monatelang ohne Änderung des Spaltungsvermögens. — Wirksame Mazerations-säfte erhält man nach Tomita<sup>2)</sup>, wenn man das zerkleinerte Organ mit der 2—3fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung über-gießt und nach Hinzufügen von 1—3 $\frac{0}{10}$  des Flüssigkeitsvolumens an Toluol einige Stunden bei Zimmertemperatur, dann über Nacht im Eisschrank stehen läßt. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wird zu den Fermentversuchen verwendet.

Die Ermittlung der Phosphatasenwirkung beruht meist auf der Bestimmung der bei der fermentativen Spaltung gebildeten Phosphorsäure. Die Bestimmung des organisch gebundenen Phosphats erfolgt nach Veraschung des zu prüfenden Materials entweder trocken durch die Soda-Salpeterschmelze<sup>3)</sup> oder naß mit der Säuregemisch-Veraschung nach Neumann<sup>4) 5)</sup>. Für die Phosphorsäure-

1) Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 282. 1923.

2) Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 161. 1922. Über Darstellung der Knochenphosphatase vgl. Martland und Robison: Biochem. Journ. Bd. 23, S. 237. 1929. Über Phosphatase des Säugetiergewebes vgl. Kay: Biochem. Journ. Bd. 22, S. 855, 1446 (Pyrophosphatase). 1928.

3) S. unten.

4) Vgl. Prakt. II, S. 350.

5) Über die kolorimetrische P-Bestimmung nach Fiske und Subbarow vgl. Prakt. II, S. 257, 259. Eine neuere kolorimetrische Methode von Kuttner und Cohen (Journ. of biol. Chem. Bd. 75, S. 517. 1927) beruht auf dem Prinzip der Reduktion von Phosphormolybdänsäure durch ganz verdünnte salzsaure Stannochloridlösung zu blauen Verbindungen, die mit Standard-PO<sub>4</sub>-Lösungen kolorimetriert werden. Bei Proben mit 0,01—0,03 mg P verfährt man so, daß man 2,5 cm<sup>3</sup> der Probe in ein bei 5 und 10 cm<sup>3</sup> markiertes Reagensglas füllt und 2 cm<sup>3</sup> einer schwefelsauren Molybdatlösung (18,75 g Natriummolybdat in 11 2,5 n-Schwefelsäure) und 0,5 cm<sup>3</sup> 1 : 200 Stannochloridlösung (10 g SnCl<sub>2</sub> in 25 cm<sup>3</sup> konz. HCl, vor dem Gebrauch 0,5 cm<sup>3</sup> davon auf 100 cm<sup>3</sup> mit dest. Wasser verdünnt) zufügt. Die Gläser werden mit Gummistöpseln verschlossen, zweimal hin- und hergeschwenkt und (nach Verdünnen auf 10 cm<sup>3</sup>) gegen gleichbehandelte Standardphosphatlösungen kolorimetriert. Als Standard dient eine Lösung von 0,4394 g getrocknetes Monokaliumphosphat in 11 mit einigen Tropfen Chloroform (1 cm<sup>3</sup> = 0,1 mg P). Vor dem Gebrauch verdünne man 5 bzw. 10 cm<sup>3</sup> auf 100 cm<sup>3</sup>; dies entspricht 0,0125 bzw. 0,025 mg P pro 2,5 cm<sup>3</sup>. — Einige Änderungen beschreiben Kuttner und Lichtenstein (Journ. of biol. Chem. Bd. 86, S. 671. 1930). Die zu untersuchende Lösung soll in 5 cm<sup>3</sup> 0,01—0,05 mg P enthalten, die

bestimmung nach der Veraschung kommt die alkalimetrische Titration nach Neumann in Betracht<sup>1)</sup> oder die Fällung mit Strychninmolybdat nach Embden<sup>2)</sup>.

Da bei vielen Untersuchungen gleichzeitig eine Gesamtphosphorbestimmung des Substrates notwendig ist, sei hier die Methode für die Bestimmung des Gesamtphosphors beschrieben.

Bestimmung des Phosphors nach H. Lieb<sup>3)</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 Molybdatniederschlages, dessen chemische Zusammensetzung nicht genau bekannt ist, wird mittels eines empirischen Faktors der Phosphor- resp. der Phosphorsäuregehalt berechnet.

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 überschichten 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 Kapillare 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.

---

Standardlösung 0,015 mg und 0,03 mg P. Dazu mischt man je 4 cm<sup>3</sup> der Molybdän-Schwefelsäuremischung (aus 1 Teil 10 n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 2 Teilen dest. Wasser + 1 Teil 7,5proz. Natriummolybdat von Kahlbaum). Hierauf gibt man je 1 cm<sup>3</sup> der verdünnten Stannochloridlösung zu, schüttelt um und kolorimetriert sofort oder in den nächsten 2 Stunden. Vgl. auch Bodansky, Hallman und Bonoff: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. Bd. 28, S. 762. 1931.

<sup>1)</sup> Vgl. Prakt. II, S. 398.

<sup>2)</sup> Vgl. S. 150 und Prakt. II, S. 261.

<sup>3)</sup> Abderhaldens 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. 1923.

2. Schwefelsäurehaltige Salpetersäure. Man gießt  $30 \text{ cm}^3$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $D = 1,84$ ) zu einem Liter  $\text{HNO}_3$  ( $D = 1,19 - 1,21$ ). Letzte erhält man durch Vermischen von  $357 \text{ cm}^3$   $\text{HNO}_3$  von  $D = 1,40$  mit  $500 \text{ cm}^3$   $\text{H}_2\text{O}$ .

3. 2prozentige wässrige Lösung von reinem Ammoniumnitrat. Wenn die Lösung nicht schon schwach sauer reagiert, ist sie mit einigen Tropfen  $\text{HNO}_3$  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 Azeton, das keine über  $60^\circ$  siedenden Anteile enthält und frei von Aldehyd ist.

7. Reinste, feingepulverte kalzinierte 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 [0,2—0,3 $\%$ ]) sind 10—20 und mehr mg Substanz erforderlich. Das Platinschiffchen muß dann entsprechend [ $20 \times 5 \times 4 \text{ mm}$ ] größer sein), setzt einen Überschuß des Soda-salpetergemisches 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  $\text{HNO}_3$  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 Kapillare 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,



Abb. 67.

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 Filterröhrchen (Abb. 67). 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 Filterröhrchen mit eingeschmolzener Glasplatte (Firma Schott), die man noch mit einer Lage Asbest beschicken kann.) Das Filterröhrchen wird zuerst mit Ammoniak behandelt, um 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 Alkohols und Äther oder besser Azeton getrocknet.

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

Das erst unmittelbar vor dem Absaugen aus dem Exsikkator genommene Filterröhrchen wird sofort auf die Wage gelegt und die Zeit von der Entnahme aus dem Exsikkator bis zur Wägung notiert. Man wäge am besten nach 3—5 Minuten, ohne die Ge-

wichtskonstanz des Röhrchens abzuwarten. Die Genauigkeit braucht nur 0,05—0,1 mg zu erreichen (da der Niederschlag rund 69 mal so schwer ist wie das zu bestimmende Element), wozu jede analytische Wage 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. 68 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.

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 Azeton (oder einmal mit Alkohol und zweimal mit Äther), worauf es aus der Absaugvorrichtung entfernt, abgewischt und in den Exsikkator 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.

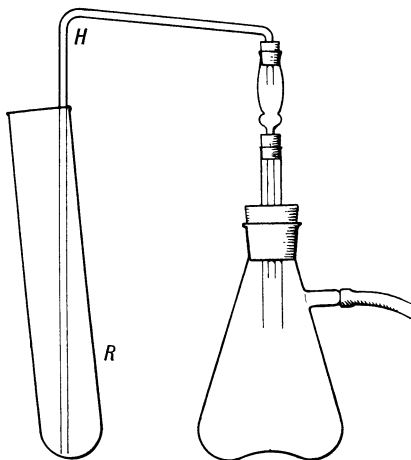


Abb. 68.

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 Milligrammen, 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<sup>1)</sup> fällt die Phosphorsäure nach Lieb in 100 cm<sup>3</sup> Jenaer Bechergläsern und bestimmt das Ammonphosphormolybdat titrimetrisch. Nach dem Stehen über Nacht wird die Mutterlauge vorsichtig durch 5—7 cm gehärtete Filter (Schleicher-Schüll) abgossen 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 (genau messen) 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 $\frac{0}{00}$ iger Phenol- oder Thymolphthaleinlösung versetzt, angesäuert (3—5 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$ -n-Säure im Überschuß, die auch genau bestimmt werden) 10 bis 15 Minuten gekocht, unter der Wasserleitung abgekühlt und mit  $\frac{1}{10}$ -n-NaOH 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>2)</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 cm<sup>3</sup>) aufgefüllt; wenn nötig, wird diese Flüssigkeit trocken 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.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 129, S. 64. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 113, S. 138. 1921.



Die so erhaltene klare und farblose Lösung („Molybdänsalpetersäure“) bleibt, solange keine Molybdänsäure ausfällt, verwendbar. (Nach Filtration kann auch eine getrübbte Lösung verwendet werden.) Das eigentliche Fällungsreagens wird immer erst unmittelbar 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, z. B. in einer Schenck-Fällung (vgl. S. 336) nach Entfernung des Quecksilbers durch Schwefelwasserstoff und nach Vertreibung des Schwefelwasserstoffs) 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 Goochtiiegel, die mindestens 1½ Stunde lang bei 105—110° getrocknet sind, unter Anwendung sehr geringen Unterdruckes mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe. 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 Goochtiiegel bei 105—110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (mindestens 90 Minuten) 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.

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.

Beispiele für Ansätze für die Phosphatase nach  
Neuberg<sup>1)</sup>.

Für Phosphatase aus Hefe. Hauptversuch: 5proz. Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium 100,0 cm<sup>3</sup>, Hefe 10,0 g,

<sup>1)</sup> Vgl. Oppenheimer-Pincussen l. c. S. 746.

Toluol 5,0 cm<sup>3</sup>. Kontrollversuch I: 5proz. Lösung von saccharosephosphorsaurem Natrium 100,0 cm<sup>3</sup>, H<sub>2</sub>O 10,0 cm<sup>3</sup>, Toluol 5,0 cm<sup>3</sup>. Kontrollversuch II: Wasser 100,0 cm<sup>3</sup>, Hefe 10,0 g, Toluol 5,0 cm<sup>3</sup>.

Für Phosphatase aus Pferdeniere. Hauptversuch: Monophenylphosphorsaures Kalium 2,0 g, Organsaft 200 cm<sup>3</sup>, CaCO<sub>3</sub> 4 g, Toluol 2 cm<sup>3</sup>. Kontrollversuch I: Das Kaliumsalz 1,0 g, H<sub>2</sub>O 100 cm<sup>3</sup>, CaCO<sub>3</sub> 2 g, Toluol 1 cm<sup>3</sup>. Kontrollversuch II: Organsaft 200 cm<sup>3</sup>, CaCO<sub>3</sub> 4 g, Toluol 2 cm<sup>3</sup>.

Von den Phosphatasen seien erwähnt:

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

Bestimmung nach Neuberg und Karczag<sup>2)</sup>.

Als Substrat dient Natriumglyzerophosphat 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>3)</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 Magnesiainmischung und reduziert Fehlingsche Lösung kräftig. — Die Saccharophosphatase ist auch in Unterhefe vorhanden. Beide wirken sowohl in neutraler als auch 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. 222) anzugreifen, solange sie nicht in Form von Hefensaft von der lebenden Zelle abgetrennt ist, und zeigt

<sup>1)</sup> Vgl. Grosser u. Husler: Biochem. Zeitschr. Bd. 39, S. 1. 1912. — Nemeč: Biochem. Zeitschr. Bd. 93, S. 94. 1919; A. Nemeč: Bd. 137, S. 570. 1923. — Akamatsu: Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 184. 1923.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 60 (64). 1913.

<sup>3)</sup> Djenab u. Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 82, S. 391. 1917. Vgl. ferner Neuberg u. Behrens: Biochem. Zeitschr. Bd. 170, S. 254. 1926,

eine Empfindlichkeit gegen Toluol, die der Saccharophosphatase fremd ist“ (Djenab und Neuberg l. c. S. 411).

Bestimmung der Plasmaphosphatase nach Bodansky<sup>1)</sup>

Zu 1 cm<sup>3</sup> zweimal zentrifugiertem Plasma werden 7 cm<sup>3</sup> Wasser und 2 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$  mol. Veronal-Puffer (vgl. S. 66) zu  $p_h$  8,6 gegeben. Diese Mischung wird in Reagensgläsern (die mit Glasstopfen versehen sind) mit 1 cm<sup>3</sup> einer Glycerinphosphatlösung. (Natrium- $\beta$ -Glycerophosphatlösung mit etwa 5 mg P pro cm<sup>3</sup>.) Nach einem einmaligen Umdrehen des Reagensglases stellt man es in ein Wasserbad von 37°. Nach 2 Stunden wird das Glas rasch abgekühlt und mit 5 cm<sup>3</sup> 10proz. Trichloressigsäure versetzt. In etwa 14 cm<sup>3</sup> Filtrat wird das anorganische Phosphat bestimmt. Bodansky benutzt hierzu die Methode von Kuttner und Cohen (vgl. S. 145)<sup>2)</sup> mit geringer Modifikation.

Über Hexosephosphorsäure<sup>3)</sup> vgl. S. 222.

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

Die Sulfatase katalysiert den Zerfall der Schwefelsäureester. Nach Neuberg<sup>5)</sup> sind drei Arten von Sulfatasen zu unterscheiden: 1. Phenol-sulfatase. Sie hydrolysiert die esterschwefelsauren Salze der Phenole und damit gleichzusetzender Verbindungen. 2. Senföglukosido-sulfatase; sie spaltet die Estersulfate der Senföglukoside. 3. Chondrosulfatase. Sie zerlegt die Chondroitinschwefelsäure.

Die Sulfatasen finden sich nach Neuberg und Mitarbeitern in der Takadiastase sowie in tierischen und menschlichen Organen, besonders reichlich in Niere und Leber.

Zur Bereitung eines Mazerationssaftes werden 50 g Organ-

<sup>1)</sup> Proc. of the soc. f. exper. Biology and Medicine Bd. 28, S. 761. 1931. Vgl. auch Kay: Biochem. Journ. Bd. 22, S. 1446. 1928; Journ. of biol. Chem. Bd. 89, S. 235, 249. 1930. Über Serumphosphatase wie auch über andere Phosphatasen vgl. Roche: Bull. Soc. Chimie biol. Bd. 13, S. 841. 1931.

<sup>2)</sup> Kuttner u. Cohen: Journ. of biol. Chem. Bd. 75, S. 517. 1927. Kuttner u. Lichtenstein: Ebenda Bd. 86, S. 671. 1930. Raymond u. Levene: Ebenda Bd. 79, S. 621. 1928. — Über Spaltung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycerophosphatase vgl. Kay u. Lee: Ebenda Bd. 91, S. 134. 1931.

<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 u. Vollbrecht: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 116, S. 277. 1921. — Über Chlorophyllase vgl. Willstätter u. Stoll: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 378, S. 18. 1910; Bd. 380, S. 148. 1911; ferner Mayer: Planta (Berlin) Bd. 11, S. 294. 1930.

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

<sup>5)</sup> Vgl. Die Naturwissenschaften Bd. 19, S. 484. 1931.

brei mit dem doppelten Volumen Wasser unter Zusatz von 1—3% des Flüssigkeitsvolumens an Toluol in einer Pulverflasche während 6 Stunden bei Zimmertemperatur ausgelaut.

**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 Azetontrockenpräparate. Ein gutes Trockenpräparat wird gewonnen, indem die feinzerschnittenen Gewebe rasch in die etwa 7fache Menge reinen, frisch über  $\text{CaCl}_2$  destillierten Azeton unter dauerndem Umrühren eingetragen und dann 10 Minuten kräftig im Mörser verrieben werden. Darauf wird abgesaugt und dieselbe Operation mit der dreifachen Menge Azeton 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.

Zum Nachweis der Sulfatasewirkung läßt man das zu untersuchende Fermentmaterial auf eine 1proz. Lösung von phenolschwefelsaurem Kalium  $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{OSO}_3\text{K}$  in destilliertem Wasser bei 37—40° einwirken. Die aus der organischen Bindung in Freiheit gesetzte Schwefelsäure weist man nach, indem man eine kleine Probe der Reaktionsflüssigkeit mit Essigsäure versetzt, klar filtriert und darauf mit Bariumazetat versetzt. Bei der quantitativen Bestimmung der Sulfatasewirkung wird die abgespaltene Schwefelsäure als Bariumsulfat bestimmt. Arbeitet man dabei ohne Neutralisationsmittel, so kann die abgetrennte Schwefelsäure direkt mit Bariumazetat in der klar filtrierten essigsauren Lösung gefällt werden. Will man neutralisieren, so dient hierzu und zum Abfangen der entstehenden Schwefelsäure  $\text{CaCO}_3$  als Bodenkörper. Es wird dann nicht das entstehende Sulfat, sondern der unzerlegt gebliebene Anteil bestimmt.

Beispiel<sup>1)</sup>: 25 g Leberbrei, 1,5 g phenolätherschwefelsaures Kalium in 150 cm<sup>3</sup> Wasser, 1,5 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> des Gemisches entnommen, in einen 50 cm<sup>3</sup> Meßkolben hineinpipettiert, darauf mit 10,0 cm<sup>3</sup> alkalischer Chlorbariumlösung versetzt, die 1 Volumen 10proz. Lösung von  $\text{BaCl}_2 + 2$  Volumen gesättigten Barytwassers enthält, und auf 50 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Nach 24stündigem Stehen wird durch ein trockenes Faltenfilter filtriert; 35,0 cm<sup>3</sup> werden zur Analyse entnommen. Die Lösung wird mit 25proz. Salzsäure stark angesäuert

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

und 1 Stunde lang zum Sieden erhitzt, wodurch die im Filtrat enthaltene Menge ungespaltenen Schwefelsäureesters hydrolysiert wird. Die ausgeschiedene Menge Bariumsulfat wird gewogen<sup>1)</sup>.

## B. Kohlehydratspaltende Fermente.

### Saccharase (Invertin).

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

Ein für orientierende Versuche gut brauchbares, wenn auch noch sehr unreines Präparat erhält man nach Michaelis wie folgt: 100 g frische Beckerhefe werden in einem Mörser zunächst mit wenig, dann immer mehr Wasser gut verrührt, insgesamt 220 cm<sup>3</sup>, mit 5 cm<sup>3</sup> Chloroform versetzt und 4—5 Tage verschlossen im Brutschrank gehalten. Dann wird das Gemisch mit einigen Tropfen starker Essigsäure versetzt und etwa 20 g feinpulveriges Kaolin zugegeben, gut durchgeschüttelt und nach einigen Minuten durch ein großes Faltenfilter filtriert. Der erste Teil des Filtrats ist oft noch trübe, er wird in die Vorratsflasche zurückgegossen und das Filtrat erst dann endgültig aufgefangen, wenn eine leicht gelbliche, aber völlig klare Lösung durchläuft. Das Ferment hält sich, mit etwas Chloroform oder Toluol versetzt, im Eisschrank so gut wie unbeschränkt in voller Wirksamkeit. Die Saccharase wird also in diesem unreinen Zustande von Kaolin nicht adsorbiert, während das gereinigte Ferment von Kaolin adsorbiert wird.

Darstellung der Saccharase aus Hefe. Da ein kurzes Zerreiben, Abpressen und Ausziehen mit Wasser nur einen kleinen Teil der Invertase aus der Hefe freimacht, ist es nötig, durch vorherige Autolyse der Hefezellen das Zellprotoplasma zu verflüssigen und so die Saccharase freizulegen.

Für die Hefeautolyse<sup>2)</sup>, die die präparative Gewinnung der Saccharase zweckmäßig gestaltet, hat Willstätter verschiedene Verfahren ausgearbeitet<sup>3)</sup>. 1. Das Verfahren der 4—7 tägigen Autolyse bei Zimmertemperatur durch Einwirkung von Toluol auf die mit Wasser verdünnte Hefe nach C. S. Hudson, das eine Enzym-anreicherung aufs Doppelte von der in der Trockenhefe ermittelten Konzentration erlaubt. 2. Das ähnliche Verfahren der Neutral-

<sup>1)</sup> Über fermentative Spaltung der Chondroitinschwefelsäure vgl. Neuberger u. Hofmann: *Biochem. Zeitschr.* Bd. 234, S. 344. 1931.

<sup>2)</sup> Willstätter, Schneider und Bamann: *Zeitschr. f. physiolog. Chem.* Bd. 147, S. 248 (und zwar 264). 1925.

<sup>3)</sup> Vgl. Waldschmidt-Leitz: *Die Enzyme* S. 166.

autolyse verdünnter Hefe, nämlich unter Neutralisation der austretenden Säure, das zu Enzymlösungen von etwa dreifach gesteigerter Konzentration führt. 3. Das Verfahren der raschen Autolyse bei neutraler Reaktion, bestehend in der ein- bis zweitägigen Einwirkung von Chloroform auf unverdünnte Hefe und nachfolgender Verdünnung und Neutralisieren; der Reinheitsgrad der Autolysate ist ähnlich dem nach dem zweiten Verfahren beobachteten. 4. Das Verfahren der fraktionierten Autolyse unverdünnter Hefe durch Abtötung mit Toluol unter Neutralisation, rasche Abtrennung des austretenden, invertinarmen Verflüssigungssaftes nach etwa einer Stunde und Weiterführung der Autolyse bis zu einem Tage; dieses Verfahren, das sich insbesondere bei der Verarbeitung enzymreicher Hefen bewährt hat, führt zu einer etwa 4—8fachen Steigerung der enzymatischen Konzentration, verglichen mit der des Ausgangsmaterials.“

Ein Beispiel, das das letzte Verfahren illustrieren soll, sei aus der Arbeit von Willstätter, Schneider und Bamann (l. c., S. 267) mitgeteilt. 340 g invertinreiche Hefe, die abgepreßt 23,5% Trockengewicht hatte, enthielt beim Zeitwert (S. 166) 19,4 83 S-E (S. 169), etwa soviel wie 5 kg gewöhnliche Hefe. Die Hefe, vorgewärmt im Thermostaten, wurde bei 30° kräftig mittels eines dicken Glasstabes mit 35 cm<sup>3</sup> auf 30° erwärmten Toluol verrührt. Die Verflüssigung erfolgte in 45 Minuten zu einem recht dünnflüssigen Brei. Man verdünnt mit 340 cm<sup>3</sup> Wasser von 30°; man wartet mit dem Abtrennen noch etwa 1—1½ Stunden. Dann füllt man zu 1 l auf, trennt mittels der Zentrifuge die Heferückstände ab, die noch mit 1 l Wasser von 30° ausgewaschen wurden. Die Heferückstände werden sogleich mit 340 cm<sup>3</sup> toluolgesättigtem Wasser von 30° unter Zusatz von Toluol aus dem Zentrifugierbecken herausgespült. Die Autolyse nimmt in Thermostaten bei 30° ihren Fortgang. Nach beispielsweise 5 und 7 Stunden entnimmt man, um den zeitlichen Verlauf der Freilegung zu verfolgen, Proben von 5 cm<sup>3</sup>, die klar filtriert zur Bestimmung des Vergleichszeitwertes angewandt werden, ½ später ¼ cm<sup>3</sup> reicht dafür. Die entstehende Invertinlösung ist schon bald sehr konzentriert. (In dem angeführten Beispiel wurde 50proz. Spaltung der 4,75proz. Rohrzuckerlösung in 10,44 und 9,54 Minuten erreicht, also von 1 cm<sup>3</sup> Invertin, der Definition des Vergleichszeitwertes gemäß in 2,61 und 2,38 Minuten). An diesem Punkt wird die Autolyse unterbrochen; die Dauer ist also ein Tag. Vor der Isolierung der Lösung wird der dünne Brei zur Beseitigung von etwas gelöstem Eiweiß vorsichtig unter tüchtigem Umrühren mit n/20-Essigsäure angesäuert bis zur Rotfärbung von Lackmus. Dann säuert man noch etwas mehr an,

indem man mit Methylrot auf  $p_h$  3,5—4 einstellt. Dafür waren 220 cm<sup>3</sup> der Essigsäure erforderlich. Das Autolysat wird mittels der Zentrifuge von Heferückständen abgetrennt, mit ein wenig geglühtem Kieselgur geklärt. Nach dem Filtrieren durch große dünne Filter stellt man die Reaktion der Flüssigkeit mit verdünntem Ammoniak wieder auf neutral ein, z. B. auf vollem Umschlag von Bromkresolpurpur.

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 Bleiazetat, 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 Bleiazetat oder man fällt zuerst mit MgCl<sub>2</sub> die Phosphorsäure und enteißt das Filtrat mit Bleizucker.

Die benutzte Hefe soll durch Aufschlänmen des Hefebreies in 10—20fachen Volumen Wasser und nachfolgender Dekantation von den Verunreinigungen befreit werden. Man wiederholt das Waschen, bis die bräunliche Beimischung von Hopfenharzen verschwunden ist. Der gereinigte Hefebrei wird in Säcken aus Filterleinen gefüllt, auf einer Presse von überschüssigem Wasser befreit, dann abgenutscht. Die gepreßte Hefe ist bei Eisschranktemperatur 3 bis 6 Tage haltbar. 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

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

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

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“, vgl. S. 161, Fußnote.)

Verfahren nach Euler und Josephson<sup>1)</sup> Als Ausgangsmaterial dient eine durch Vorbehandlung mit Rohrzucker und Phosphat angereicherte Unterhefe (vgl. oben). Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert. Unter Zusatz von etwas Toluol und Äthylazetat wird die Hefe der Autolyse überlassen. Nach einer Woche wird filtriert. Der Saft wird unter kräftigem Rühren mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt<sup>2)</sup>, 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. Diese 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 vor dem Absaugen vorhandenen 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.

<sup>1)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 446 u. 453. 1923.

<sup>2)</sup> Nach Untersuchungen von Willstätter und Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 193. 1924; Bd. 142, S. 257. 1925 kann man mit geringen Alkoholkonzentrationen von etwa 20—40% des Gesamtvolumens einige Begleitstoffe mit einem äußerst geringen Teil des Invertins ausscheiden. Erst wenn die Konzentration des Alkohols 40% übersteigt, beginnt die Flüssigkeit sich zu trüben und bei 50% ist das gesamte Ferment mit vielen Begleitstoffen niedergeschlagen. Die adsorptionshemmenden Abbauprodukte bleiben in der 50proz. alkoholischen Mutterlauge zurück. Zur Vermeidung der Saccharasezerstörung bei der Alkoholfällung versetze man die Autolysate vor der Fällung mit Essigsäure zu  $p_h$  4,5—4,8. Dabei ist es vorteilhaft, die Fermentlösung auf 0°, den Alkohol auf etwa — 20° zu halten. Vgl. S. 165.



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.

Verfahren nach Euler und Josephson unter Verwendung von gealtertem Autolysensaft<sup>1)</sup>. Hefe wird ca. 1 Monat teils bei Zimmertemperatur, teils bei 35° autolytisiert. 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 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 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 HgCl<sub>2</sub> 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> Tonerdehydratemulsion (1,7 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) versetzt. Die Elution wird dialysiert, und zwar zuerst gegen reines Wasser, 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.

<sup>1)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 453.

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

Verarbeitung gealterter Hefeautolysate. 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. 5) eingetragen. Die Suspension wird mit Ammoniak auf einen  $p_h = 5,5$  gebracht und durch gehärtete Filter gesaugt. Mit 0,4 proz. Dinatriumphosphat wird eluiert, 3 Tage dialysiert und fünf Viertelstunden elektrodialysiert.

Ein Beispiel der Fraktionierung mit gealtertem Autolysat<sup>3)</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.

<sup>1)</sup> Nach Willstätter u. Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 193. 1924. Vgl. auch Willstätter u. Wassermann: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 123, S. 181. 1922.

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

<sup>3)</sup> Willstätter u. Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 217. 1923.

Verarbeitung frischer Hefeautolysate. Mehrere Kilo frischer Hefe, die man zweckmäßig vorher einige Tage in 2 proz. Zuckerlösung unter Zusatz von Nährsalzen<sup>1)</sup> und bei dauernder Durchlüftung auf 30° gehalten hat, werden mit 60 cm<sup>3</sup> Chloroform 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

<sup>1)</sup> Vgl. v. Euler u. Svanberg: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 107, S. 269. 1919 (S. 286). — Svanberg: Bd. 109, S. 65. 1920. — v. Euler u. af Ugglas: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 70, S. 279. 1910.

Beispiel zur Vorbehandlung einer Unterhefe: 75 Liter der benutzten Hefe wurden 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 Hebers 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 ½ 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 Hebers 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. 1919) 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> (evtl. 1,0 g Asparagin), 2 g Rohrzucker auf 100 cm<sup>3</sup> Wasser; nach 40 stündiger Vorbehandlung bei ca. 27° wird abdekantiert.

Die günstigsten Bedingungen für die Invertasevermehrung liefert eine Gärführung mit minimaler Zuckerkonzentration (Willstätter, Lowry u. Schneider: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 146, S. 158. 1925). Beispiel: 200 g gut gewaschene, abgepreßte Hefe werden in 4 l Nährlösung verteilt. (Die Nährlösung enthält je 8 g primär. Kaliumphosphat und primär. Ammoniumphosphat, sowie je 2 g Kaliumnitrat und wasserhaltiges Magnesiumnitrat.) Die Suspension wird in einem 10-l-Filterstutzen auf 28° vorgewärmt. Die Temperatur soll während des ganzen Versuches 27° betragen. Die Flüssigkeit wird mit mechanischer Rührung in starker Bewegung gehalten. Aus einer tubulierten Flasche tropft durch eine Kapillare 20 proz. Rohrzuckerlösung ein, und zwar so, daß 100 cm<sup>3</sup> Lösung (10%<sub>0</sub> Zucker bezogen auf das Gewicht der abgepreßten Hefe) in 1 Stunde einfließen. Man trennt zweckmäßig die Hefe nach je 2—3 Stunden von der alkoholischen Flüssigkeit und erneuert die Nährlösung; dies soll in den ersten 12 Stunden 3—4 mal erfolgen; später ist ein Wechsel erst nach 8—12 Stunden nötig. Die Hefe muß abzentrifugiert werden, wenn ein Dekantieren nicht mehr gut möglich ist. Praktisch wird die Führung so vorgenommen, daß man in 4—8 Stunden 50—80%<sub>0</sub> Zucker eintropfen läßt, so dann durch eine engere Kapillare den Rest über Nacht. Die übliche Versuchsdauer beträgt etwa 17 Stunden.

$p_n$  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 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  $p_n$  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. 7, 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° 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 Kalziumkarbonats neutralisiert. Die Lösung wird im Vakuum eingeengt 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%) 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  $250 \text{ cm}^3$  pro S.-E. Bei höherem Reinheitsgrad ist hingegen der Adsorptionswert in konzentrierter Lösung größer (1 E. in  $50 \text{ cm}^3$ ).

Nach der Reinigung durch Voradsorption trägt man die vorher ausgetastete Menge  $\text{Al}_2\text{O}_3$  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. 5): Angewandt 58 E. vom S.-W. 108 nach Kaolinadsorption und Eiweißfällung.

Voradsorption (4,2% adsorbiert) in Verdünnung 1 E. in  $200 \text{ cm}^3$ , neutral mit 0,6 g, Restlösung 56,7 E.

Voradsorption (10,1%) unter denselben Bedingungen mit 0,6 g, Restlösung 50,8 E. weiter verarbeitet 49 E.

I. Adsorption:  $n/1000$  Essigsäure, 1 E. in  $250 \text{ cm}^3$  mit 0,95 g bei A.-W. 41,2. Elution (nach Vorelution von 2,25 E mit  $\text{NH}_3$ ) mit Phosphatlösung, eingedampft, dialysiert, 35,3 E.

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

Voradsorption (7,1%)  $n/1000$  Essigsäure, 1 E. in  $55 \text{ cm}^3$  mit 0,053 g bei A.-W. 39; el. S.-W. 0,7. Restlösung 23,7 E.

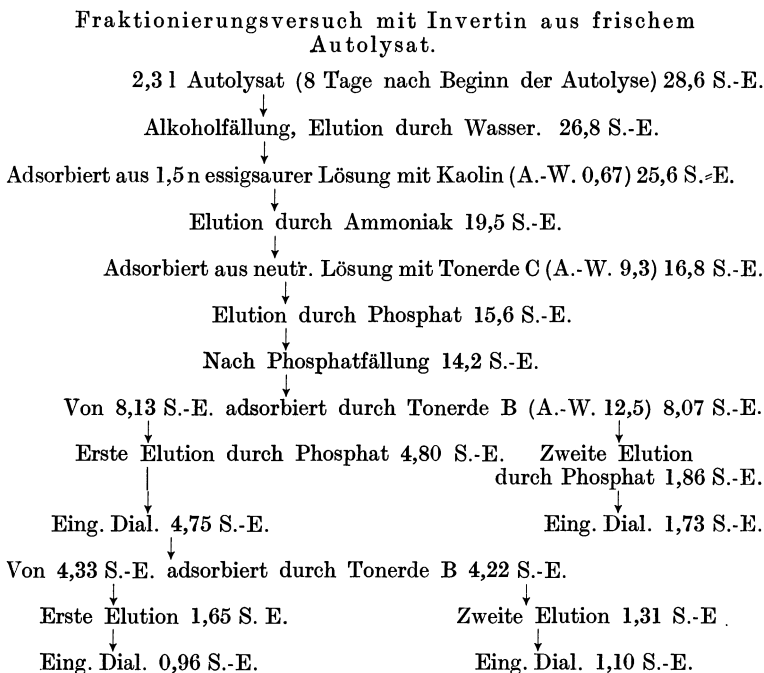
II. Adsorption:  $n/1000$  Essigsäure. 1 E. in  $63 \text{ cm}^3$ , mit 0,182 g bei A.-W. 115. Elution mit Phosphatlösung 17,4 E. (83%), nach Dialysieren 16,9 E. S.-W. 3,57; nach 8 Tagen 2,76, weiter verarbeitet 12,3 E. Voradsorption (17%)  $n/1000$  Essigsäure, 1 E. in  $50 \text{ cm}^3$  mit 0,01 g bei A.-W. 210, mit Adsorption von 2,1 E. zerstört 71%, Restlösung 10,2 E.

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

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.



Nach Untersuchungen von Willstätter, Schneider und Wenzel<sup>2)</sup> ist das beste Verfahren zur Freilegung des Invertins die fraktionierte Autolyse. Es 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 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

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

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

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. Das vom Papier abgelöste Kieselgur wurde mit Wasser verrührt und 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. — Mit Tonerde wurden bei 0° 1,48 S.-E. adsorbiert und mit Diammonphosphat 1,46 S. E. eluiert.

Durch anteilweise Bildung eines adsorbierend wirkenden Niederschlages von Bleiphosphat in den Invertinlösungen gelingt

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

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

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 Bleiazetat.

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 cm<sup>3</sup> 0,5-n-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung ( $p_h$  4,5) aufgeschwemmt oder gelöst, brauchen, um zu 20 cm<sup>3</sup> 20proz. Rohrzuckerlösung hinzugefügt, diese bei 15,5° so weit zu spalten, daß nach Aufhebung der Multirotation durch Soda die Drehung bei Na-Licht (bei 20° polarisiert) 0° beträgt („Normalbedingungen“); dann sind 75,93% des vorhandenen Zuckers gespalten. R. Willstätter u. 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 20%ige Zuckerlösung mit etwa so viel Invertinlösung auf 100 cm<sup>3</sup> bringt, daß die Hydrolyse bis zur Nulldrehung 60—180 Minuten erfordert. Zwischen 50—75% Spaltung werden 25 cm<sup>3</sup> des Reaktionsgemisches in ein mit 5 cm<sup>3</sup> 2-n-Soda beschicktes Reagensglas eingetragen, das mindestens 15 Minuten im Thermostaten von 20° bleibt. Der Zeit- (Minuten-) Wert  $\pm 0 = t$  Min. wird entweder graphisch ermittelt, oder man berechnet  $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$  und daraus die Nulldrehungszeit aus der Beziehung Reaktionskonstante  $\times$  Null-

<sup>1)</sup> Sullivan u. Tompson: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 57, S. 834. 1890.

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



drehungszeit = 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 g Rohrzucker (entsprechend 1,25 g Maltosehydrat) in 25 cm<sup>3</sup> Lösung bei  $p_h$  4,3 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 Glukoside. Er bezieht sich auf die für jede Hydrolyse angebbare Zeit, die für den Umsatz von 50% des vorhandenen Substrates nötig ist. Zeitwert und Vergleichszeitwert sind der fermentativen Konzentration umgekehrt proportional. (Bei der Maltase wird auf  $p_h$  6,8 eingestellt.)

2. Der „Saccharasewert“ (S.-W.) nach Willstätter und Kuhn<sup>2)</sup> stellt das Reziproke des Zeitwerts nach O. Sullivan und Tompson dar. (Ein anschauliches Maß für die Reinheit der Präparate. Da der Saccharasewert umgekehrt proportional dem Zeitwert ist, so gibt der Saccharasewert die Anzahl „Saccharaseeinheit“ [S.-E. s. S. 169] in 50 mg Trockensubstanz an).

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°

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

Dem es ist bei 18°

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

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

<sup>2)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 509. 1923.

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

Die Inversionskonstante wird berechnet nach der Gleichung

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

wo  $R$  die Anfangsdrehung,  $L$  die Enddrehung,  $\alpha$  die Drehung zur Zeit  $t$  bezeichnen. Dann ist (da  $\alpha = 0$ )  $\log 1,36/0,36 = 0,5772$  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>.

Versuchsansatz: 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:

$$\text{If.} = \frac{132 \cdot 4,8}{2 \cdot 88} = 220.$$

<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.

4. Die Saccharaseeinheit (S.-E.) nach Willstätter und Kuhn<sup>1)</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.

Über Darmsaccharase (aus Schweine- und Menschendarm) vergleiche Euler und Svanberg<sup>2)</sup>. — Zur Untersuchung kommt der fein zerschnittene Darm oder dessen Glyzerinextrakt.

Bestimmung der Saccharase vgl. S. 180.

### Maltase.

Das Ferment katalysiert die Spaltung von Maltose in zwei Mol Traubenzucker. Es ist eine  $\alpha$ -Glukosidase.

Darstellung der Maltase. E. Fischer benutzte bei seinen Untersuchungen<sup>3)</sup> wässrige mit Toluol versetzte Extrakte der vorher scharf getrockneten Bierhefe.

Darstellung aus Hefe nach Willstätter, Oppenheimer und Steibelt<sup>4)</sup>. Wichtig ist es, die bei der Autolyse der Hefen entstehenden Säuren zu neutralisieren.

Beispiel: 88 g gewaschene und abgepreßte untergärige 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) geschüttelt. 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 Magnesiumkarbonat 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 geschüttelt und die sauer reagierende Flüssigkeit mit 1proz. Ammoniak neutralisiert.

Ein weiteres Verfahren von Willstätter und Steibelt<sup>5)</sup> zeigt folgendes Beispiel: Die etwa 2,5 g Trockenhefe entsprechende Menge Frischhefe (etwa 11 g) wird im Becherglas mit 1 cm<sup>3</sup> Essigester ver-

<sup>1)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 509. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 43. 1921.

<sup>3)</sup> Ber. d. chem. Ges. Bd. 28, S. 1433. 1895.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 110, S. 232 (237). 1920.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 111, S. 168. 1921.

setzt 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 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. Bei höchstens 1 tägigem Stehen gehen 95—100% der Maltase in Lösung. Zu Versuchen benutzt man diese Suspension, die mit Wasser verdünnt wird.

Oder man verfährt nach Willstätter und Bamann<sup>1)</sup> so, daß man etwa 10 g abgepreßte Hefe, deren Trockengewicht nicht unter 25% betragen darf, mit 1 g feingepulvertem Diammonphosphat verreibt, bis zur vollständigen Verflüssigung, die in 8—10 Minuten erreicht ist. Dann verdünnt man mit Wasser auf 50 cm<sup>3</sup> und trägt je 20 cm<sup>3</sup> Suspension (entspr. 1 g Trockenhefe) in die Maltaselösung ein. Um Maltaselösungen von noch höherem Reinheitsgrad zu gewinnen, empfiehlt Bamann kurze Zeit nach dem Verdünnen mit Wasser, nach etwa 60 Minuten, die bei der Hefeverflüssigung ausgetretenen Stoffe durch Zentrifugieren abzutrennen und die wieder mit Wasser und Essigester (s. S. 157) angesetzte Hefemasse 1 Tag der Autolyse zu überlassen.

Kaolin adsorbiert Maltase, jedoch sie geht im Adsorbat zugrunde. Aus Tonerdeadsorbaten (in denen die Maltase weiter wirkt) läßt sich Maltase mit Maltaselösungen nur bei gleichzeitigem Zusatz von Phosphatmischung ( $p_h$  6,8) reichlich eluieren<sup>2)</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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O und 22,5 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( $p_h$  6,8) in 50 cm<sup>3</sup> enthalten<sup>3)</sup>. Die Fermentmenge in 1 g Trockensubstanz vom Zeitwert 1 (also die Fermentmenge, die 2,5 g Maltosehydrat in 50 cm<sup>3</sup> bei 30° und bei  $p_h$  6,8 zu 50% in 1 Minute spaltet) heißt 1 Maltase-Einheit. Die Kinetik der Maltase ist jedoch von Präparat zu Präparat verschieden, die gefundenen Einheiten daher nur scheinbare.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 151, S. 242. 1926.

<sup>2)</sup> Vgl. Willstätter u. Kuhn: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 116, S. 53 (63). 1921.

<sup>3)</sup> Willstätter, Oppenheimer u. Steibelt: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 110, S. 233. 1920. Vgl. auch Willstätter u. Steibelt: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 201. 1921.

In weiteren Untersuchungen ist Willstätter und Bamann<sup>1)</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  $\text{AlO}_2\text{H}$  (vgl. Darstellung S. 7) 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 bei  $0^\circ$  angewandt 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  $10 \text{ cm}^3$  kaltes Hefeautolysat wurde die ebenfalls auf  $0^\circ$  gekühlte Suspension des kurz gealterten Tonerdegels (entsprechend  $0,20 \text{ g Al}_2\text{O}_3$ ) 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 gegen  $80\%$  der angewandten Menge.

2. Befreiung der Maltase von Saccharase. Am zweckmäßigsten geht man von der Brauereihefe aus, die man nur bis zur vollständigen Freilegung der schneller in Lösung gehenden Maltase autolytiert. Die Abtrennung der Saccharase aus dem Hefeautolysat wurde mit dem Gel  $\text{AlO}_2\text{H}$  ausgeführt. (Auf  $10 \text{ cm}^3$  Autolysat  $0,64 \text{ g Al}_2\text{O}_3$  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.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 151, S. 273. 1926.

Es sei darauf hingewiesen, daß wegen der hohen Empfindlichkeit der Maltase, die Maltaselösungen ständig bei 0° aufzubewahren und alle Operationen damit rasch und bei niedrigerer Temperatur vorzunehmen sind.

Bestimmung der Maltase vgl. S. 195.

### 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 Glukose, Benzaldehyd und Blausäure spalten.

Die Spaltung des Amygdalins geht so vor sich, daß zuerst die Amygdalase die Spaltung des Amygdalins in Mandelsäurenitrilglukosid (Prunasin) und Glukose bewirkt. Dann wird durch die  $\beta$ -Glukosidase (Prunase) das 2. Mol Glukose abgetrennt. Übrig bleibt das Benzaldehydzyanhydrin, von dem durch ein drittes Ferment, Benzzyanase oder Oxynitrilase, die Blausäure abgetrennt wird.

Auch andere  $\beta$ -Glukoside werden von  $\beta$ -Glukosidase gespalten (Salizin, Helizin 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° 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 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 Exsikkator 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

<sup>1)</sup> Willstätter u. Oppenheimer: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 121, S. 183. 1922.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 173. 1921.

alkalische Reaktion verschwunden ist, unter Zusatz von einigen  $\text{cm}^3$  Ammoniak. Die vereinigten Auszüge, etwa  $\frac{1}{2}$  l, enthalten 60% der Trockensubstanz der Mandeln. Ein Teil der Eiweißstoffe wird jetzt mit Essigsäure ( $300 \text{ cm}^3$  n/10 oder  $60 \text{ cm}^3$  n/2) ausgefällt und abfiltriert; der Niederschlag enthält 5—8% vom Emulsin. Das Filtrat wird mit der 4fachen Menge Alkohol 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 Kalziumchlorid. Das Präparat ist in Wasser klar löslich. Das erhaltene Pulver (2,5—3,5 g) enthält 60—75% der ursprünglichen Fermentmenge.

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  $1\frac{1}{2}$  Volumteilen der Fermentlösung Alkohol gefällt, das gefällte Präparat abzentrifugiert, mit Alkohol und Äther gewaschen, an der Luft getrocknet.

In der essigsäuren Lösung ist das Emulsin praktisch beständig. Äthyl- und Propylalkohol schädigen beim Aufbewahren des Fermentes nach Helferich nicht, Methylalkohol hingegen stark.

Als Maß für die Emulsinwirkung dienen die Zeitwerte der 50proz. Spaltung von Amygdalin, Prunasin,  $\beta$ -Methylglukosid, Laktose und Raffinose: die Anzahl Minuten, die 1 mg Emulsinpräparat oder enzymhaltige Pflanzensubstanz brauchen würde, um bei 30° und optimalem  $p_{\text{H}}$  50% der theoretischen Monosemenge

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 147, S. 1, 154. 1925.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 159, 166. 1921 u. Helferich, Speidel u. Toeldte: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 128, S. 99. 1923. Vgl. auch Helferich u. Schneidmüller: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 198, S. 100. 1931.

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  $\beta$ -Methylglukosid (mit  $\frac{1}{2}$  H<sub>2</sub>O), 0,07034 g Laktose (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 Glukose aus Amygdalin, 1 Mol Glukose aus Prunasin,  $\beta$ -Methylglukosid, Laktose, 1 Mol Galaktose aus Raffinose. (Vgl. auch S. 196.)

Die optimale Wasserstoffzahl ist für die Hydrolyse des Amygdalins  $p_h = 6$ , für Prunasin und  $\beta$ -Methylglukosid 4,9, für Laktose 4,4 und für Raffinose 4,1 (in allen Fällen mit Azetatgemisch eingestellt).

Eine Trennung der  $\beta$ -Glukosidase vom stärkespaltenden Ferment im Emulsin beschreibt K. Josephson<sup>1)</sup>. Die  $\beta$ -Glukosidase (geprüft auf Salizin) wird durch Tonerde fraktioniert adsorbiert und mit einer 0,75proz. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung eluiert. Die Mandel-Amylase befindet sich in der Restlösung.

Bestimmung des Emulsins vgl. S. 194.

### Fermentative Synthese von Glukosiden.

$\alpha$ -Methylglukosid. Darstellung nach Bourquelot, Hérisséey und Bridel<sup>2)</sup>. Man bereitet zunächst eine Lösung von  $\alpha$ -Glukosidase, indem man 10 Teile getrocknete untergärrige Bierhefe mit 200 Teilen Toluolwasser mazeriert und nach 24 Stunden filtriert.

Man mischt dann 200 cm<sup>3</sup> dieser Flüssigkeit mit 100 cm<sup>3</sup> 10proz. Glukoselösung, dann der Reihe nach mit 450 cm<sup>3</sup> Wasser und 200 cm<sup>3</sup> Methylalkohol und füllt mit Wasser zu 1 l auf. Man läßt bei Zimmertemperatur unter bisweiligem Umschütteln so lange (etwa 14 Tage) stehen, bis die Drehung in der 2 dm-Röhre, die anfangs + 1° 4' betrug, auf + 2° 12' angestiegen ist. Dann filtriert man, setzt einige g Kalziumkarbonat hinzu und kocht auf. Man filtriert wieder, dampft im Vakuum auf ca. 200 cm<sup>3</sup> ein und setzt nach dem Erkalten 2 g frische Preßhefe (Bäckerhefe) hinzu, um die noch vorhandene Glukose zu vergären. Nach Beendigung der Gärung (nach 18—20 Stunden) filtriert man, kocht und destilliert dann im Vakuum nach Zusatz von ein wenig Kalziumkarbonat zur Trockne. Den Rückstand kocht man am Rückflußkühler mit 400 cm<sup>3</sup> wasserfreiem Essigäther aus. Man filtriert und läßt bei Zimmertemperatur verdunsten. Dabei scheidet sich das  $\alpha$ -Methylglukosid aus. Ausbeute 1,2 g. Durch wiederholtes Aus-

<sup>1)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 58, S. 2726. 1925.

<sup>2)</sup> Journ. de Pharmac. Chim. [7] Bd. 7, S. 152. 1913.



kochen des Rückstandes mit Essigäther kann man noch etwa 2 g Glukosid erhalten. (Schmelzpunkt  $166^{\circ}$ ;  $\alpha_D = +156,8^{\circ}$ .)

$\beta$ -Methylglukosid. Darstellung nach Bourquelot und Bridel<sup>1</sup>). Man löst 2,0565 g Glukose in 100 cm<sup>3</sup> 70proz. Methylalkohol (die Mischung enthält 59,7 g Methylalkohol), fügt 0,5 g Emulsin hinzu und läßt bei Zimmertemperatur stehen, bis die Drehung (im 2 dm-Rohr)  $-0^{\circ}50'$  erreicht hat. (82,55% der Glukose sind mit dem Alkohol verbunden.) Dann dampft man die Flüssigkeit im Vakuum zur Trockne und nimmt den Rückstand mit siedendem Essigäther auf. Beim Erkalten scheidet sich das Glukosid aus<sup>2</sup>).

Das Optimum der Bildungsgeschwindigkeit liegt bei  $p_h = 4,6$  [K. Josephsohn<sup>3</sup>].

### Laktase.

Laktase katalysiert die Spaltung von Milchzucker in seine Komponenten, die Glukose und die Galaktose. Auch eine Reihe von Derivaten der Laktose wird gespalten.

Darstellung. Nach Angaben von E. Fischer<sup>4</sup>) gibt weder frische, noch an der Luft getrocknete Hefe an Wasser (bei  $30^{\circ}$ , während 20 Stunden) Laktase 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 Oppenheimer<sup>5</sup>) frische Reinkulturen von *Saccharomyces fragilis*, die mit wiederholt sterilisiertem und filtriertem Hefedekokt unter Zusatz von 7—10% Laktose bei  $26^{\circ}$  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> Iproz. Ammoniaks neutralisiert. Im Verlauf der nächsten 6 Std. muß etwa sich noch bildende Säure wieder mit 1proz. NH<sub>3</sub> vorsichtig neutralisiert werden. Nach einem, besser nach 2—3 Tagen

<sup>1</sup>) Journ. de Pharmac. Chim. [7] Bd. 22, S. 211. 1920.

<sup>2</sup>) Bourquelot, Bridel und ihre Schüler haben noch eine große Reihe von Glukosiden mittels Emulsins dargestellt, bzw. die Bildungsgeschwindigkeiten unter verschiedenen Bedingungen verfolgt, wobei sie die Glukose — auch Galaktose — in verschiedenen Alkoholen lösten und mit Emulsin versetzten. Literatur s. Olive: Bull. Soc. Chim. biol. Bd. 13, S. 254. 1931.

<sup>3</sup>) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 147, S. 155. 1920.

<sup>4</sup>) Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 27, S. 3479 (3481). 1894.

<sup>5</sup>) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 118, S. 168. 1922.

wird die Laktaselösung 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 Lackmus) mit 1% Ammoniak neutralisiert wurde. Nach einem Tage wurde die Laktaselösung abzentrifugiert.

Die Laktasewirkung 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° und optimalem  $p_h$  (= 7) in 50 cm<sup>3</sup> Lösung 2,5 g Laktose (Hydrat) zu hydrolysieren. Als Substrat dient wasserhaltiger Milchzucker von  $[\alpha]_D = + 52,53^\circ$ .

Bestimmung der Laktase vgl. S. 199.

### 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>1)</sup> seine diastatische Wirkung vollkommen ein.

Der optimale NaCl-Zusatz ist für Pankreasamylase nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse<sup>2)</sup> 0,003—0,03 Normalität. Ein Zusatz von 0,03% 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>3)</sup>]. Bakterienamylase verhält sich wie die tierische [Avery und Cullen<sup>4)</sup>].

### Speichelamylase.

Darstellung: Man sammelt den Speichel am besten mit Hilfe von Schwämmchen [Pringsheim und Gorodiski<sup>5)</sup>].

<sup>1)</sup> Bierry u. Giaja: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 143, S. 300. 1906. — Bierry: Biochem. Zeitschr. Bd. 40, S. 357. 1912.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 126, S. 143. 1923.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 71, S. 287, 302. 1920; Bd. 73, S. 10. 1921; Bd. 74 S. 217. 1922; Bd. 76, S. 227.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 32, S. 571, 582 (zit. Oppenheimer S. 693).

<sup>5)</sup> Pringsheim u. Gorodiski: Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 175. 1923. Nach Hoppe-Seyler kann man Speichel in der Weise gewinnen, daß man bei vornübergewegtem Kopfe den Mund weit öffnet, ohne dabei

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>1)</sup>:

Die Vorbehandlung der Drüsen ist die gleiche wie die bei Trypsin (siehe S. 279) 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 87proz. 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.

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>2)</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 bei Zimmertemperatur auf das 10fache ihres Volumens einengen.

Die Trennung von Amylase und Trypsin läßt sich auch durch zweimalige Einwirkung von Kaolin auf die schwach

---

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>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 126, S. 143 (159). 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 175. 1923.

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 auf 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 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.  $2\frac{1}{3}$  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 amylasefrei.

Die Amylase wird auf dieser Stufe der Reinigung noch von Tonerde adsorbiert, und zwar aus neutraler Lösung bei einem hohen (mindestens 50%) Gehalt an Alkohol. (In reinerem Zustande wird Pankreasamylase von Aluminiumhydroxyd nicht adsorbiert.) — 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> 96proz. 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, wobei ihre Wirksamkeit geschwächt wird. Eine neuerliche Adsorption der eluierten Amylase unter gleichen Versuchsbedingungen gelingt nur unvollkommen<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Über eine Reinigung der Pankreasamylase durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd und Fällung des Eluats mit Alkohol und Äther berichten Sherman, Caldwell, Adams: Journ. of biol. chem. Bd. 88, S. 295. 1930. 10 g käufliches Pankreatin werden mit 100 cm<sup>3</sup> Glycerin bei Zimmertemperatur 6 Stunden vermischt. Man zentrifugiert. Zur Glycerinlösung fügt man ihr 5faches Volumen an 0,012 mol. Phosphatpuffer von  $p_h$  5,8. Man zentrifugiert. 1 Volumen dieser Lösung wird mit 2 Volumen einer alkoholischen Al(OH)<sub>3</sub>-Suspension versetzt. (Die Suspension enthält

### Leberamylase.

Man verwendet entweder Alkohol-fällungen aus wässerigen 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> 87proz. Glycerin). Für den Auszug mit Wasser (1 g Pulver auf 10 cm<sup>3</sup> Wasser) genügt eine Extraktionsdauer von 3 Stunden; mit Glycerin ist ein 24stündiges Auslaugen bei 18° erforderlich. Die Aktivität im Glycerinauszug sinkt schon nach 3 Tagen ab. 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 Organtrocknenpulver (Holmbergh) dar, indem man den Schweineleberbrei (z. B. ca. 1800 g) mit dem gleichen Gewicht (also etwa 2 l) Azeton anrührt und nach 2 Std. filtriert, der Rückstand wird mit 1,5 l Azeton aufgeschlämmt und nach 30 Min. abgesaugt; darauf folgt eine Aufschlämmung und Schüttelung in 1 l Azeton 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 groß.

### Pflanzliche Amylasen.

Darstellung. Nach H. Euler und O. Svanberg<sup>2)</sup>. 130 g feingeriebenes 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 durch Filtration geklärt. Danach wird sie 40 Std. gegen destilliertes Wasser in Kollodiumsäckchen dialysiert<sup>3)</sup>, wobei

0,3—0,4 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> auf 100 cm<sup>3</sup> 37proz. Alkohol und 0,01 mol. Phosphat.) Man läßt mindestens 15 Minuten in Eis stehen, zentrifugiert; den Niederschlag schüttelt man schnell mit eiskaltem 0,015 mol. NaOH (bis zu  $p_h$  7,0 bis 7,3), zentrifugiert sofort, filtriert im Eisschrank und versetzt mit 1½—2 Volumen einer Alkohol-Äthermischung 1:1. Man zentrifugiert sofort, trocknet im Eisschrank im Vakuum über Schwefelsäure. Aus 40 g Pankreatin erhält man 700 mg hochaktives Material.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 68, 79. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 112, S. 193 (202). 1920. Über Einwirkung von Azetat, Phosphat und Neutralsalzen auf Malzamyase vgl. Sherman, Caldwell, Boynton, Cleaveland: Journ. amer. chem. soc. Bd. 52, S. 1669, 2436. 1930.

<sup>3)</sup> Vgl. hierzu Euler u. Svanberg: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 110, S. 177. 1920.

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 Malzamylyase wird, wie Euler fand<sup>1)</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>2)</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<sup>3)</sup>.

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. 200. Über Amylase-Einheit vgl. S. 207.

### 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>4)</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.

Erforderliche Lösungen. Lösung 1: 40 g reines kristallisiertes Kupfersulfat  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  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

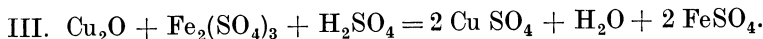
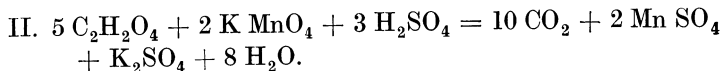
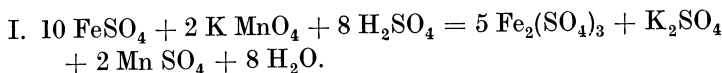
<sup>1)</sup> Chemie der Enzyme. 1. Teil, S. 88. 1920.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 164, S. 117. 1925.

<sup>3)</sup> Über ein Komplement der Malzamylyase vgl. Pringsheim und Fuchs: Ber. der dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 1762. 1923. — Pringsheim und Schmalz: Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 108. 1923. — Pringsheim und Beiser: Ebenda. Bd. 148, S. 336. 1924.

<sup>4)</sup> Bull. de la soc. de chim. biol. Bd. 35, S. 1285. 1906. (Vgl. hierzu Lesser: Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 252. 1913.)

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. Die Umsetzungen werden durch folgende Gleichungen erläutert:



Da Ammoniumoxalat  $\text{C}_2\text{O}_4(\text{NH}_4)_2 + \text{H}_2\text{O}$  das Mol.-Gew. 142,1, und Kupfer das Atomgewicht 63,6 hat, erhält man die dem angewandten Ammonoxalat entsprechende Menge Cu durch Multiplikation des abgewogenen Ammonoxalats mit  $\frac{2 \cdot 63,6}{142,1} = 0,8951$  und die 1 cm<sup>3</sup> Permanganatlösung entsprechende Menge Kupfer, indem man die angewandten Gramm Ammoniumoxalat mit 0,8951 multipliziert und durch die Anzahl Kubikzentimeter Permanganat teilt, die vom Ammonoxalat verbraucht worden sind.

Beispiel: Die Titerstellung habe ergeben, daß 22,0 cm<sup>3</sup> der Permanganatlösung zur Oxydation von 0,250 g Ammoniumoxalat erforderlich seien. 0,250 g Ammonoxalat entsprechen  $0,250 \cdot 0,8951 = 0,2238$  g Cu. Dann entspricht jeder Kubikzentimeter der Permanganatlösung  $\frac{0,2238}{22} = 10,17$  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 haben, 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 in der Saugflasche 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 beistehende Tabelle. Es entspricht:

Glukose in mg	Cu in mg	Glukose in mg	Cu in mg	Glukose in mg	Cu in mg	Glukose in mg	Cu in mg
10	20,4	27	53,4	44	84,7	61	114,5
11	22,4	28	55,3	45	86,4	62	116,2
12	24,3	29	57,2	46	88,2	63	117,9
13	26,3	30	59,1	47	90,0	64	119,6
14	28,3	31	60,9	48	91,8	65	121,3
15	30,2	32	62,8	49	93,6	66	123,0
16	32,2	33	64,6	50	95,4	67	124,7
17	34,2	34	66,5	51	97,1	68	126,4
18	36,2	35	68,3	52	98,9	69	128,1
19	38,1	36	70,1	53	100,6	70	129,8
20	40,1	37	72,0	54	102,3	71	131,4
21	42,0	38	73,8	55	104,1	72	133,1
22	43,9	39	75,7	56	105,8	73	134,7
23	45,8	40	77,5	57	107,6	74	136,3
24	47,7	41	79,3	58	109,3	75	137,9
25	49,6	42	81,1	59	111,1	76	139,6
26	51,5	43	82,9	60	112,8	77	141,2

<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. 182.)

Glukose in mg	Cu in mg	Glukose in mg	Cu in mg	Glukose in mg	Cu in mg	Glukose in mg	Cu in mg
78	142,8	84	152,5	90	162,0	96	171,4
79	144,5	85	154,0	91	163,6	97	173,1
80	146,1	86	155,6	92	165,2	98	174,6
81	147,7	87	157,2	93	166,7	99	176,2
82	149,3	88	158,8	94	168,3	100	177,8
83	150,9	89	160,4	95	169,8		

Für andere Zuckerarten sind von Bertrand ebenfalls solche Tabellen aufgestellt worden (vgl. S. 186).

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 NaF 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 ent-eiweißt 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 Kristallen 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 mit destilliertem Wasser 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 einem Erlenmeyer-Kolben von 250—300 cm<sup>3</sup> ausgeführt. Als Bertrand-Lösung I (die Lösung von Kupfersulfat) dient am besten eine solche, die im Liter noch eine bestimmte Menge

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 69, S. 84. 1910; vgl. auch ebenda Bd. 65, S. 323. 1910.

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 nebenstehende Tabelle.

Cu in mg	Glukose in mg	Cu in mg	Glukose 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-Zuckerlö-  
sung entsprechenden Kubik-  
zentimeter Permanganat von  
dem titrierten Permanganat-  
wert abgezogen werden, son-  
dern es sind zunächst die  
diesen beiden Permanganat-

zahlen zugeordneten Traubenzuckermengen auszurechnen und diese voneinander zu subtrahieren. Man titriert am besten mit  $\frac{1}{20}$  oder  $\frac{1}{50}$  n-Kaliumpermanganatlösung. 1 cm<sup>3</sup> einer  $\frac{1}{20}$  n-Permanganatlösung entspricht 3,18 mg Cu.

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 NaF 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.

Nummehr 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 0,5proz. 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 Uhrsälchen 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 kapillarer 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 so lange je 2 Tropfen hinzu, bis die auf diese Weise beobachtete Färbung  $5\text{--}7$  Sek. überdauert. Nunmehr schüttele 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

$\frac{1}{100} n$ Permanganat cm <sup>3</sup>	Zucker mg	$\frac{1}{100} n$ Permanganat cm <sup>3</sup>	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

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 cm<sup>3</sup> 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 obenstehende Tabelle.

### 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	33	64,8	56	105,7	79	143,7
11	22,6	34	66,7	57	107,4	80	145,3
12	24,6	35	68,5	58	109,0	81	146,9
13	26,5	36	70,3	59	110,9	82	148,5
14	28,5	37	72,2	30	112,6	83	150,0
15	30,5	38	74,0	61	114,3	84	151,6
16	32,5	39	75,9	62	115,9	85	153,2
17	34,5	40	77,7	63	117,6	86	154,8
18	36,4	41	79,5	64	119,2	87	156,4
19	38,4	42	81,2	65	120,9	88	157,9
20	40,4	43	83,0	66	122,6	89	159,5
21	42,3	44	84,8	67	124,2	90	161,1
22	44,2	45	86,5	68	125,9	91	162,6
23	46,1	46	88,3	69	127,5	92	164,2
24	48,0	47	90,1	70	129,2	93	165,7
25	49,8	48	91,9	71	130,8	94	167,3
26	51,7	49	93,6	72	132,4	95	168,8
27	53,6	50	95,4	73	134,0	96	170,3
28	55,5	51	97,1	74	135,6	97	171,9
29	57,4	52	98,8	75	137,2	98	173,4
30	59,3	53	100,6	76	138,9	99	175,0
31	61,1	54	102,3	77	140,5	100	176,5
32	63,0	55	104,0	78	142,1		

Galaktose  $[\alpha]_D^{20} = + 80,16^0$ 

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

Mannose  $[\alpha]_D^{20} = + 13,92^0$ 

Zucker in mg	Kupfer in mg	Zucker in mg	Kupfer in mg
10	20,7	60	113,3
20	40,5	70	130,2
30	59,5	80	146,9
40	78,0	90	163,3
50	95,9	100	179,4

Sorbitose  $[\alpha]_D^{20,5} = - 42,80^0$ 

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  $[\alpha]_D^{18} = + 120,65^0$ 

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  $[\alpha]_D^{19} = + 18,84^0$ 

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  $[\alpha]_D^{20} = +130,5^{\circ}$ 

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
32	35,5	55	60,3	78	85,1		

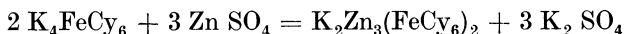
Laktose  $[\alpha]_D^{19} = +54,52^{\circ}$ 

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 Ferrizyanidlösung. Das gebildete Ferrozyanid wird als Zinkverbindung ausgefällt:



und das überschüssige Ferrizyanid 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 Kaliumferrizyanid (zur Analyse) und 10,6 g wasserfreiem Natriumkarbonat 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 unmittelbar vor dem Gebrauch kleinere Mengen mit Kaliumjodid bereiten.

3. Essigsäure. 3 cm<sup>3</sup> eisenfreier Eisessig Kahlbaum auf 100 cm<sup>3</sup> Wasser.

4. Stärkelösung. 1proz. in gesättigter Kaliumchloridlösung.

5. Thiosulfatlösung  $\frac{1}{200}$  n. 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 in eiweißhaltigen Lösungen (z. B. Blut):

a) n/10 Natronlauge | alle 8 Tage frisch zubereiten aus 2 n

b) 0,45% Zinksulfat | NaOH und 45proz. Zinksulfatlösung.

Ausführung:

Enteiweißung: In einen Glaszylinder (15 × 150 mm) werden 1 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$ -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 Kapillarpipette, die zwischen den Marken eine Länge von 10—12 cm bei einer Gesamtlänge von 20 cm haben soll, abgemessen, in die Zinkhydroxydaufschwemmung ausgeblasen und die Kapillarpipette

<sup>1)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 56, S. 1758. 1923.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 135. S. 46. 1922; Bd. 137, S. 92. 1922.

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 kleinen Trichter von 3—4 cm Durchmesser, der mit einem kleinen Filter aus ausgewaschener, mit Wasser naß gemachter Watte 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> warmem Wasser nachgewaschen.

Zuckerbestimmung: Zu dem Filtrat werden 2 cm<sup>3</sup> der alkalischen  $\frac{1}{200}$ -n-Ferrizyanidlösung (Lösung 1) zugesetzt und das Präparatenglas wird 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen soll innerhalb von 6 Std. titriert werden. Es werden 3 cm<sup>3</sup> der Kaliumjodid-Natriumchlorid-Zinksulfatlösung zugefügt, gemischt, dann wird mit 2 cm<sup>3</sup> der 3proz. Essigsäure angesäuert und das ausgeschiedene Jod unter Zusatz von 2 Tropfen der Stärkelösung mit der  $\frac{1}{200}$ -n-Thiosulfatlösung 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

Tabelle zur Mikrozuckerbestimmung nach Hagedorn-Jensen.  
cm<sup>3</sup> n/200 Natriumthiosulfat-mg Glukose.

	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



Glukose umgerechnet (an Hand der Tabelle) und dann in Abzug gebracht. Z. B. in einem Versuch werden von 0,1 cm<sup>3</sup> Blut 1,28 cm<sup>3</sup> Na-Thiosulfat verbraucht, im Blindversuch 1,94 cm<sup>3</sup> Na-Thiosulfat, also in Glukose umgerechnet 0,127 — 0,010 = 0,117 mg Glukose in 0,1 cm<sup>3</sup> Blut<sup>1)</sup>.

Methode nach Willstätter und Schudel<sup>2)</sup>.

Das Verhalten der Aldosen gegen Hypojodit ermöglicht auf Grund einer streng stöchiometrisch verlaufenden Reaktion eine quantitative Bestimmung neben Fruktose 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. 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 Glukonsäure 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 Glukoselösung wird mit ungefähr dem 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>—4fachen der erforderlichen Menge Jod in n/10-Lösung versetzt; man läßt bei Zimmertemperatur unter gutem Umschütteln sehr langsam das 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>fache der erforderlichen Menge von n/10 NaOH, das aus alkoholfreiem Natriumhydroxyd hergestellt sein muß, zutropfen und 12—15 Min., bei sehr geringer Zuckermenge besser 20 Min., stehen. Dann säuert man mit verdünnter Schwefelsäure schwach an (man verwendet bei 10 cm<sup>3</sup> 0,1-n-Jodlösung und 15 cm<sup>3</sup> 0,1-n-Natronlauge etwa 2 cm<sup>3</sup> 1-n-Schwefelsäure) und titriert mit Thiosulfat bei Gegenwart von Stärke zurück.

Bei der Konzentration von 1<sup>0</sup>/<sub>10</sub> Glukose und Mengen von beispielsweise 100 mg ist der größte Fehler 0,1 mg, der durch-

<sup>1)</sup> Vgl. auch Prakt. II, S. 208 (hier auch die Modifikation von Issekutz und Both).

<sup>2)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 51, I, S. 780, 1918. Vgl. auch Pauchard: Journ. Pharm. et de Chimie. Bd. 118, [Serie 8, Bd. 3], S. 248. 1926.

schnittliche Fehler beträgt demnach einige Zehntel Prozent der Substanz; bei 0,1 proz. Glukose und Mengen von 10 mg bleibt der Fehler in den einzelnen Bestimmungen unter  $1\frac{1}{2}\%$ .

Die Oxydation der Aldosen erfolgt auch mit 0,01-n-Jodlösung<sup>1)</sup>. Bei 10 cm<sup>3</sup> 0,01-n-Lösung alkalisiert man mit 1,5 cm<sup>3</sup> 0,1-n-Natronlauge, läßt 20—30 Minuten stehen, säuert mit 2 cm<sup>3</sup> 0,1-n-Schwefelsäure an und titriert mit 0,01 n-Thiosulfat.

Unter den angegebenen Verhältnissen verbraucht Rohrzucker und Fruchtzucker gar kein Hypojodit. Die Hypojodit-Methode ist daher zur Bestimmung von Aldehydzucker neben Fruktose und Saccharose geeignet. Die Oxydation eines Moleküls Aldohexose (Glukose, Mannose, Galaktose) ist unabhängig von der Konfiguration und entspricht zwei Sauerstoffäquivalenten.

Bei Anwendung einer größeren Zuckermenge und längerer Einwirkungsdauer bleibt die Oxydation der Glukose nicht bei der Glukonsäure stehen, sondern geht weiter. Durch Zusatz von Puffern kann man einen Teil der Fehler ausschalten<sup>2)</sup>. Die Zuckerlösung, die zweckmäßig nicht mehr als etwa 100 mg Glukose 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 Raumeile 0,2 molarer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 0,2 molarer NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugefügt ( $p_n = 10,1 - 10,2$ ) und die Mischung im Dunkeln  $1\frac{1}{2}$  bis höchstens 2 Std. stehen gelassen. Danach wird mit 12 cm<sup>3</sup> 25 proz. 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 Karbonatgemisch und Schwefelsäure verbraucht wurde. Von der Differenz entspricht 1 cm<sup>3</sup> 0,1-n-Jodlösung 9,005 mg Glukose (oder 18,15 mg kristallwasserhaltiger Laktose oder Maltose; 17,15 mg Maltose-Anhydrid, vgl. auch S. 207).

### 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

<sup>1)</sup> Meyerhof u. Lohmann: Biochem. Zeitschr. Bd. 185, S. 113. 1927.

<sup>2)</sup> Vgl. Auerbach u. Bodländer: Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 36, S. 602. 1923.

Spaltung beträgt:  $L_{\max} = R_{\max} (0,417 - 0,005 t^0)$ , wobei  $L_{\max}$  die maximale Linksdrehung einer vollständig invertierten Rohrzuckerlösung vom anfänglichen Drehungsvermögen  $R_{\max}$  bei der Temperatur  $t$  bedeutet.

Bei der Beobachtungstemperatur von  $20^0$  wird die Drehung  $D = \pm 0^0$ , wenn  $75,93\%$  des vorhandenen Rohrzuckers gespalten sind. Als Beobachtungstemperatur ist jede Temperatur von  $0-40^0$  geeignet.

Der optimale  $p_h$  wird gewöhnlich durch primäres Alkali-phosphat ( $p_h = \text{ca. } 4,5$ ) oder Azetatpuffer (z. B. Natriumazetat: 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. 27.

Bei der polarimetrischen Bestimmung ist auf die Multirotation der Traubenzuckerlösung zu achten. Man kann durch Zufügen von Soda die endgültige Einstellung beschleunigen. Zur Ausführung der Zeitwertbestimmung nach Willstätter und Racke<sup>1)</sup> vgl. S. 166.

#### Bestimmung der Maltase.

Zur Maltasebestimmung sind die oben angeführten Reduktions-Methoden auch brauchbar. Da Maltose ein geringeres Reduktionsvermögen besitzt als Glukose (vgl. S. 188), 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  $1/10$  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>2)</sup>. Die Maltose (Hydrat) wird als 10 proz. Lösung gebraucht und mit einem Gehalt von  $20\%$  des Puffers bei  $30^0$  im Meßkolben bereitet.  $25 \text{ cm}^3$  dieser Mischung werden mit Enzymlösung und Wasser von derselben Temperatur auf das doppelte Volumen gebracht. Zur Polarisation werden  $25 \text{ cm}^3$  der  $30^0$  warmen Versuchslösung in  $5 \text{ cm}^3$  2-n-Soda eingetragen. Die Anfangsdrehung der Versuchslösung nach dem Verdünnen mit der Sodamenge beträgt in 2 dm Rohr  $10,80^0$ , für  $[\alpha]$  als Hydrat =  $129^0$ , die Enddrehung wäre bei vollkommener Spaltung  $4,40^0$ , und die Drehungsabnahme  $6,40^0$ . Findet man z. B. nach 98,3

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

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 110, S. 232. 1920. Vgl. auch Oppenheimer-Pincussen: l. c. S. 858.

Minuten nach Beginn des Versuchs den Drehungswinkel  $7,37^{\circ}$ , so ist die Drehungsabnahme  $10,80^{\circ} - 7,37^{\circ} = 3,43^{\circ}$  und der Grad der Spaltung in  $\% \frac{3,43}{6,40} = 53,6^1$ .

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  $5 \text{ cm}^3$  Blutserum oder  $5 \text{ cm}^3$  des wässrigen Leberextraktes wurden mit  $5 \text{ cm}^3$  einer 10 proz. Maltoselösung und  $0,2 \text{ cm}^3$  Toluol bei  $30^{\circ}$  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>: Die Proben wurden mit  $25 \text{ cm}^3$  einer 5 proz., unter Erwärmen hergestellten Lösung von Zinkazetat in 96 proz. Alkohol versetzt, mit Alkohol im Meßkolben auf  $50 \text{ cm}^3$  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 Emulsins. Nach Willstätter und Csányi<sup>4)</sup>.

Prinzip: Die bei der Spaltung gebildete Blausäure wird abgedampft und die entstandene Glukose nach Bertrand bestimmt.

Ausführung: Im Jenaer Rundkolben von  $\frac{1}{2}$  l Inhalt werden  $10 \text{ cm}^3$  1,0 proz. Amygdalinlösung mit etwas Toluol, mit 2—4  $\text{cm}^3$  Puffermischung (n/10 Azetatgemisch im Verhältnis 20 Natriumazetat : 1 Essigsäure) und so viel Wasser versetzt, daß mit der

<sup>1)</sup>  $[\alpha_{20}^D]$  von Maltose (Anhydrid) = + 136,0<sup>0</sup> (Gleichgewichtsform);  $[\alpha_{20}^D]$  von Glukose = + 52,5<sup>0</sup>. Die molekulare Drehung von Maltose = + 465,4<sup>0</sup>, die von Glukose = + 94,01<sup>0</sup>. — 1 Maltose  $\rightarrow$  2 Glukose. — 1 Mol Maltose gibt nach vollständiger Spaltung eine Drehungsabnahme von  $465,4 - 2 \cdot 94,01 = 277,38^{\circ}$ , d. h.  $277,38^{\circ}$  entsprechen 1 Mol;  $1^{\circ}$  Abnahme entsprechen  $0,003605 \text{ Mol} = 1,233 \text{ g}$  Maltose (Anhydrid).

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 14, S. 217. 1908.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 15, S. 495. 1891.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 172. 1921. — Willstätter u. Oppenheimer: Ebenda Bd. 121, S. 185. 1922

hinzuzufügenden Enzymlösung das Volumen auf 20,0 cm<sup>3</sup> kommt und im Thermostaten auf 30,0<sup>0</sup> 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>1)</sup>: Angewandt wurde ein mit Essigsäure angesäuerter 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) 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. Daraus ergaben sich 33,4 mg Glukose, d. i. 47,5% Spaltung. Für diese Spaltung würde 1 mg nach der Proportionalität zwischen Geschwindigkeit und Enzymmenge 480 Min. erfordern. — Aus der Reaktionskurve der Amygdalin-spaltung ergibt sich zum Spaltungsgrad von 47,5% 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. 166). 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%.

Die quantitativ weit geringeren Wirkungen des Fermentes auf andere Glukoside 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-Azetatmischung).

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

<sup>1)</sup> Willstätter u. Csányi: l. c. S. 178.

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  $\beta$ -Methylglukosid mit 0,5 H<sub>2</sub>O, Mol.-Gew. 203,1,
- 0,1164 g Helizin (mit  $\frac{3}{4}$  H<sub>2</sub>O), Mol.-Gew. 297,6<sup>1)</sup>,
- 0,1119 g Salizin, Mol.-Gew. 286,1,
- 0,1002 g  $\beta$ -Phenylglukosid, 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 Salizinlösung bei 0° wird bestimmt.

Ausführung: 2,5000 g Salizin 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-Azetat 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  $1,7 \cdot 10^{-5}$ . 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 Salizinlösung 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 Glukosids in Traubenzucker und Saligenin + 1,33°. Diese Glukosidlösung 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 Kaliumkarbonat, das sich fast momentan auflöst, zugegeben, und zwar 0,2 g auf 5 cm<sup>3</sup> Glukosidlösung. Dadurch wird die Wirkung des Fermentes unterbrochen und die Rotation des entstandenen Zuckers stellt sich auf den Endwert ein.

<sup>1)</sup> Die Kupferzahlen des Gemisches von Glukose + Hydrochinon neben Arbutin, wie auch diejenigen des Gemisches Glukose + Salizylaldehyd neben Helizin vgl. Willstätter und Oppenheimer: l. c., S. 187.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 117, S. 159. 1921. — Helferich, Speidel u. Toeldte: Ebenda Bd. 128, S. 99. 1923.

Die Eigendrehung des Emulsins wird bei jedem Versuch für die gleiche Konzentration nach Zugabe der gleichen Menge Kaliumkarbonat 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 Glukosids bei den angewandten Konzentrationen von Glukosid und Ferment nötig ist, d. h.: Zeitwert eines Präparates (vgl. S. 166).

K. Josephson bedient sich<sup>1)</sup> ebenfalls der polarimetrischen Methode. Zur Aufhebung der Mutarotation wurden bei den Versuchen mit  $\beta$ -Methylglukosid, Salizin und Helizin 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 Glukose vollkommen beendet war (3 Stunden).

Spez. Drehung einiger Glukoside und die Enddrehung bei vollständiger hydrolytischer Spaltung derselben.

Glukosid	Spez. Drehung	Faktor zur Berechnung der Enddrehung aus der Anfangsdrehung
$\beta$ -Methylglukosid . . . . .	— 32,6	— 1,49
Salizin . . . . .	— 63,91	— 0,517
Helizin . . . . .	— 60,43	— 0,55
Arbutin . . . . .	— 64,3	— 0,541

Die mikroquantitative Bestimmung von Blausäure, pflanzlichen Blausäureverbindungen und Emulsin nach Brunswik<sup>2)</sup>.

Prinzip: Die bei der Fermentwirkung in Freiheit gesetzte Blausäure wird bei 30—40° durch einen Kohlensäurestrom in schwach salpetersaures Silbernitrat abgeblasen. Das entstandene Silberzyanid wird auf ein Asbestfilterröhrchen gebracht und auf der Mikrowage gewogen.

Den benutzten Apparat zeigt Abb. 69.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 147, S. 1. 1925.

<sup>2)</sup> Oesterr. botan. Zeitschr. Bd. 74, S. 58. 1923.

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 Thermostaten 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 Kippischen 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

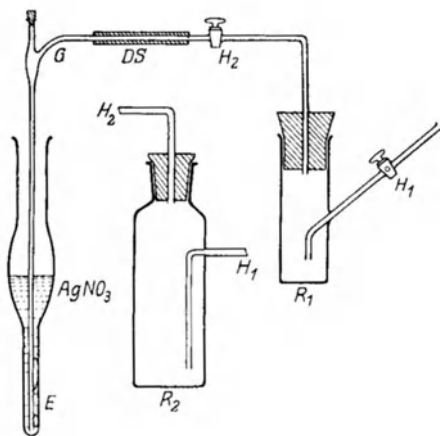


Abb. 69. Apparat zur mikroquantitativen Blausäurebestimmung ( $\frac{1}{3}$  der natürl. Größe).

$R_1$ , bzw.  $R_2$  Rezipienten.  $H_1$  und  $H_2$  Glashähne des Zu- und Ableitungsrohres,  $DS$  Druckschlauchverbindung.  $G$  Gaseinleitungsrohr,  $E$  bauchige Epruvette, mit 1 proz. Silbernitrat gefüllt.

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 Epruvette  $E$  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 Kork-

stopfen verschlossen ist. Der etwas größere Rezipient  $R_2$  ist für 10 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit bestimmt. Als Vorlage in der Epruvette dient 1 proz., mit halogenfreier Salpetersäure leicht angesäuertes Silbernitrat. — Der entstandene Silberzyanidniederschlag wird wie bei den Preglschen Vorschriften zur Wägung der Silberhalogenide behandelt. Das Absaugen erfolgt wie S. 149 bei der Phosphatbestimmung beschrieben. Gründliches Nachwaschen abwechselnd mit Wasser und 96 proz. Alkohol, Trocknen 5 Min. im „Regenerierungsblock“, 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°, die Epruvette in ein größeres Gefäß mit kaltem Wasser. — Der Zusatz von Flüssigkeiten (z. B. verdünnter Säure zum Freimachen der HCN aus dem Material bzw.



zur Beendigung der Fermentreaktion) erfolgt durch den über  $H_1$  befindlichen, erweiterten Glasansatz unter  $CO_2$ -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 Laktase.

Auch hier werden die üblichen Bestimmungsmethoden (Polarisation, Reduktion) angewandt.

Willstätter und Oppenheimer<sup>1)</sup> bestimmten die gebildete Glukose nach Bertrand, indem sie 25 cm<sup>3</sup> der 10proz. Lösung von Laktose (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  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O + 175$  mg  $KH_2PO_4$ ) versetzten, mit der entsprechenden Enzymmenge (Hefelaktase) 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 Laktose und Glukose + Galaktose<sup>2)</sup>

Laktose cm <sup>3</sup>	Glukose + Galaktose cm <sup>3</sup>	Perm. 0,160 n cm <sup>3</sup>		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

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 118, S. 170. 1921.

<sup>2)</sup> Die Kupferzahlen wurden gewonnen, indem man 5proz. Lösungen der Laktose (wasserhaltig) und der äquimolekularen Gemische von Glukose und Galaktose in verschiedenen Verhältnissen aus Büretten in

## 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).

Bestimmung der Amylase nach M. Olsson<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die Viskositätsänderung 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.

Apparat (Abb. 70): 3 gleiche Rohre  $D_{1-3}$  von 35 cm 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.

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> Azetatpuffer ( $p_h = 5,15$ ) und die gewünschte Menge Enzymlösung (Malzamyase) — bei tierischer Amylase den entsprechenden  $p_h$  und NaCl-Zusatz. Alle Lösungen müssen vorher auf 37° vor-

25 cm<sup>3</sup> Kolben einfließen ließ, woraus nach Erwärmen auf 30° 5 cm<sup>3</sup> entnommen und auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt wurden. Zur Bestimmung dienten 20 cm<sup>3</sup>.

<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. — Über eine viskosimetrische Bestimmung der Blutamyase vgl. Elman, Arneson und Graham: Arch. of int. Med. Bd. 40, S. 58. 1927; Arch. Surg. Bd. 19, S. 943. 1929. Vgl. ferner Thompson, Johnson und Hussey: J. of general Physiol. Bd. 15, S. 1. 1931.

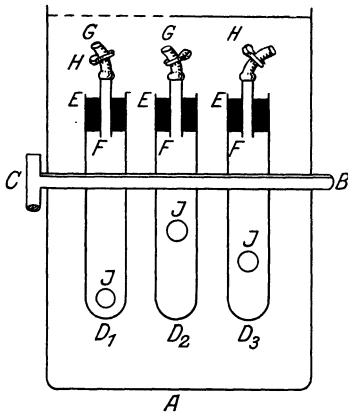


Abb. 70.

gewärmt sein. Der Gummistöpsel wird schnellstens eingepreßt. Hierbei wird alle Luft durch das Glasrohr entfernt und danach der am Glasrohr befestigte Gummischlauch, *G*, 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, *J*, mittels Chronographen festgestellt.

Im Rohre *D*<sub>1</sub> (ohne Enzym) durchläuft die Kugel die Lösung in fast konstant 48 Sek. Im Rohre *D*<sub>2</sub> (mit Enzym) wird die Aufsteigezeit kontinuierlich kleiner, und die Lösung hat schon in 1 Std. die Viskosität des Wassers beinahe erreicht, die einer Aufsteigezeit von 10 Sek. entspricht. Zur Berechnung der Resultate sind Eichkurven mit verschiedenen Stärkekonzentrationen unter sonst gleichen Bedingungen anzustellen. Man bereitet eine Reihe von Ansätzen ohne Ferment, indem man z. B. 10, 25, 38, 42, 46, 50 cm<sup>3</sup> Stärkekleister mit je 10 cm<sup>3</sup> Azetatpuffer versetzt, mit Wasser auf 72 cm<sup>3</sup> auffüllt und dann mit derselben Glaskugel bei 37° die Aufsteigezeiten in mehreren Ablesungen bestimmt. Das Ergebnis stellt man graphisch dar, indem man als Abszisse die cm<sup>3</sup> Stärkelösung, als Ordinate die Aufsteigezeiten aufträgt. Aus dieser Kurve läßt sich dann für die Messungen des fermenthaltigen Versuches auf graphischem Wege die Menge der unveränderten Stärke entnehmen.

#### Jodmethoden<sup>1)</sup>.

Auch die Methoden, die sich der Veränderung der Jodreaktion bedienen, beruhen wohl auf einer physiko-chemischen Änderung des Substrates (Karrer). Bei einer bestimmten Temperatur läßt man auf die gleichen Mengen Stärkelösung abgestufte Mengen von Fermentlösungen einwirken und beobachtet nach Ablauf einer bestimmten Zeit die Färbung, die nach Zusatz von Jod auftritt.

Ausführung nach Wohlgemuth. Eine Reihe Reagenzgläser 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 ist dasjenige Gläschen zu bezeichnen, in

<sup>1)</sup> Vgl. Wohlgemuth: Fermentmethoden S. 39.

dem zum ersten Male die blaurote Farbe auftritt. Die diastatische Kraft ( $D$  mit dem Index von Versuchszeit und Temperatur) wird daraus so berechnet, daß die Anzahl  $\text{cm}^3$  einer 1proz. Stärkelösung bestimmt wird, die durch  $1 \text{ cm}^3$  Fermentlösung unter den Bedingungen des Versuches bis zum Erythroextrin abgebaut wird. Zeigt z. B. ein Röhrchen, das  $0,0125 \text{ cm}^3$  Speichel enthält, eben die rote Farbe bei  $40^\circ$  nach 30 Minuten, so berechnet sich  $D$  folgendermaßen:  $0,0125 \text{ cm}^3$  Speichel bauen entsprechend der Versuchsanordnung in 30 Minuten  $5 \text{ cm}^3$  1proz. Stärke ab;  $1,00 \text{ cm}^3$  Speichel baut demnach in 30 Minuten  $400 \text{ cm}^3$  1proz. Stärke ab; also  $D_{30}^{40} = 400$ . — Bei der Diastase (Amylase)-Bestimmung im Urin sollen nach Wohlgemuth<sup>1)</sup>  $10 \text{ cm}^3$  1proz. Stärkelösung mit  $10 \text{ cm}^3$  Phosphatpuffer ( $\frac{1}{3}$  mol.  $p_h$  7,2) versetzt werden; dann füllt man mit 1proz. NaCl-Lösung auf  $100 \text{ cm}^3$  auf und gibt etwas Toluol hinzu. Mit dieser Stärkelösung werden dann die Reihen angesetzt.

Ausführung nach Michaelis<sup>2)</sup>: Man kocht 2,5 g lösliche Stärke in  $500 \text{ cm}^3$  0,3proz. NaCl-Lösung auf und füllt in 7 Erlenmeyerkolben je  $50 \text{ cm}^3$  davon ein. Außerdem gibt man eine Mischung von  $\frac{m}{3}$  prim. Phosphat ( $10 \text{ cm}^3$  1 molar Phosphorsäure +  $10 \text{ cm}^3$  n-NaOH +  $10 \text{ cm}^3$  dest. Wasser) und von  $\frac{m}{3}$  sek. Phosphat ( $10 \text{ cm}^3$  1 molar Phosphors. +  $20 \text{ cm}^3$  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  $5 \text{ cm}^3$  einer äußerst stark verdünnten, ganz schwach hellgelben Lugolschen Lösung (etwa 1/1000 n-Jodlösung) und hält diese für die weitere Untersuchung in Bereitschaft. In die 7 Erlenmeyerkolben gibt man in Abständen von genau 2 Min. der Reihe nach je  $5 \text{ cm}^3$  eines

<sup>1)</sup> Klin. Wochenschr. 1929, II, S. 1253. Vgl. hierzu Baumann: Dtsch. Zeitschr. Chir. Bd. 216, S. 98. 1929; Klin. Wochenschr. 1929, I, S. 982.

<sup>2)</sup> Michaelis-Rona: Prakt. d. physik. Chemie. 4. Aufl., S. 149. 1930. Diese Vorschrift dient zunächst dazu, das  $p_h$ -Optimum der Fermentwirkung festzustellen.

100.—1000fach verdünnten Speichels. Dann entnimmt man aus dem Kölbchen Nr. 4 ( $p_h$  etwa 6,8) alle paar Minuten  $5\text{ cm}^3$  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  $5\text{ cm}^3$  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  $10\text{ cm}^3$   $1/1000$ -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 Farbennuance 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 Glukose bildet.

Glukose neben Maltose läßt sich qualitativ durch Kupferazetatlösung (Barfoedsches Reagens; 1proz. Lösung) erkennen, die neutral von Maltose überhaupt nicht, mit Essigsäure angesäuert erst bei 4 Min. Kochdauer reduziert wird. — Beim Kochen mit Phenylhydrazin gibt die Glukose gleich, die Maltose erst beim Abkühlen einen Niederschlag des Osazons.

Nephelometrische Methode nach Rona und van Eweyk<sup>2)</sup>.

Prinzip: Als Substrat dient Glykogen, das sehr stabile kolloidale Lösungen bildet, deren Trübungsgrad streng proportional

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 77. 1914.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 149, S. 174. 1924.

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 eingegeben. 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 Viskosität 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).

Ausführung: In eine Reihe von Meßzylindern von 100 cm<sup>3</sup> werden je 91 cm<sup>3</sup> einer Glykogenlösung von 0,3% gebracht und

<sup>1)</sup> Käufliches Glykogen ist nicht immer verwendbar.

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.

Als Beispiel folge eine Tabelle (Tab. 2), in der die erste Spalte die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und den

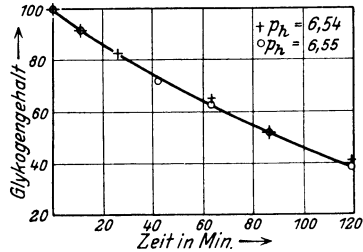


Abb. 71.

Tabelle 2 (Abb. 71).

	Zeit in Min.	Nephelometer		Um- rechnung auf Proz.	$x \cdot \frac{x}{t} \cdot 10^3 \quad K \cdot 10^5$		
		lks.	rechts		$x$	$\frac{x}{t} \cdot 10^3$	$K \cdot 10^5$
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

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 Ausgangs-

konzentration 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%<sub>0</sub> verfolgt. Die gebildeten Aldehydgruppen werden mit der Hypojodit-Titration [nach Willstätter-Schudel (S. 191)] 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%<sub>0</sub> 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%<sub>0</sub> der Stärke.

Ausführung: In einer zylindrischen Standflasche mit eingeschliffenem 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 Wägegglas 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 zugefügten Salzsäure und Umwandlung des sauren Puffer-Phosphats in sekundäres, (wozu zusammen 30 cm<sup>3</sup> erforderlich sind)

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 126, S. 143 (155). 1923.



noch das  $1\frac{1}{2}$  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<sup>1)</sup>: 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. (Infolge der Zugabe von 2 cm<sup>3</sup> n-HCl wurde die Fermentwirkung aufgehoben.) Darauf fügte man 10,01 cm<sup>3</sup> 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>  $\frac{1}{10}$ -n-Jod als Maltose berechnet.

2. Beispiel<sup>2)</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 (1,76 cm<sup>3</sup> 0,1 n) 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 bildeten, so ist  $k = 0,0236$  zu berechnen, und dies ist gleichzeitig die Anzahl der Am.-E. in den angewandten 0,5 mg.

1) l. c. S. 146.

2) l. c. S. 156.

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 Amylase erübrigt sich der Kochsalzzusatz;  $p_h$  ist durch Phosphat oder Azetat auf 5,0 einzustellen.

### Bestimmung der Malzamyase 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 Azidität 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<sup>2)</sup>.

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

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 112, S. 193 (219). 1920/21.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu v. Euler u. Myrbäck: Arkiv f. Kemi Bd. 8, S. 1. 1921; ferner Euler u. Landergren: Kolloid. Z. Bd. 31, S. 89. 1922. Vgl. auch die Abhandlung von Sabalitschka über Amylase im Handb. d. biol. Arbeitsmethoden von Abderhalden. Abt. IV, Teil 1, S. 891 (speziell S. 919 ff.). 1931.

maximo gewonnen werden kann (75%) 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°, optimaler Azidität 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% 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 50 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° erwärmt und bei dieser Temperatur gehalten. Zur Zuckerbestimmung werden 10 cm<sup>3</sup> der Lösung zu 5proz. Sodalösung gegeben und nach Bertrand titriert.

Bestimmung der Leberamylase nach Holmbergh<sup>2)</sup>: Als Substrat dient eine Mischung von 20 cm<sup>3</sup> 2proz. löslicher Stärke, 10 cm<sup>3</sup> 0,29-n-Phosphatpuffer, 1 cm<sup>3</sup> 1-n-NaCl-Lösung, die mit Wasser auf 42 cm<sup>3</sup> aufgefüllt und mit einigen Tropfen Toluol überschiehtet werden. ( $p_h = 6,9$ , Temperatur 37°  $\pm$  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 Wägerröhren 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

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 175. 1923.

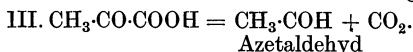
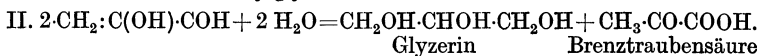
<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134, S. 68. 1924.

Gewebsteilchen in der Suspension 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 z. T. bekannten Reaktionen zusammen.

Das von Neuberg aufgestellte Gärschema ist:



Von Hexosen sind nur 4 Zucker gärfähig: Glukose, Mannose, Fruktose und Galaktose. Die Galaktose wird schwerer vergoren als die anderen Hexosen. Nach 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 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 ausgepreßte Hefe (noch mit etwa 70%

<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.

Wassergehalt) wird in einer großen Schale mit feinem Quarzsand und mit Kieselgur oder Infusorienerde im Verhältnis 1000 g gepreßte 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 Azetondauerhefe 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 Azeton 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 Azeton liegen. Hierauf wird nach kurzem Absetzen die Flüssigkeit größtenteils abgegossen 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 Azeton, rührt 2 Min. durch und saugt die Flüssigkeit wieder auf der Nutsche möglichst vollständig ab. Die Masse

<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.

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 Azetondauerhefe stellt ein fast weißes, staubtrockenes Pulver dar, das monatelang gut wirksam bleibt. Das aus Oberhefe gewonnene Produkt ist gewöhnlich weniger aktiv als das aus Unterhefe gewonnene.

#### 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 absitzen. 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 getrocknet, 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 Mazerationsäfte 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 Oberfläche Oxydation und Feuchtigkeitsaufnahme begünstigt [Sobotka<sup>2)</sup>].

Mazeration der getrockneten Hefe mit Wasser. Zur Darstellung von wirksamem Hefesaft werden 50 g Hefe mit

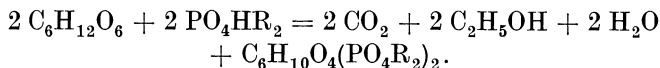
<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 73, S. 447. 1911. Zur Darstellung von Trockenhefe vgl. auch Sobotka: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 134. S. 10. 1924.

<sup>2)</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-Jensen: Biochem. Zeitschr. Bd. 154, S. 236. 1924.

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 (die Masse schäumt beträchtlich und soll gelegentlich umgerührt werden) 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>1)</sup> bei  $p_h = 6,5 \pm 0,3$ ; bei  $p_h = 5$  ist die Gärungsgeschwindigkeit nur 50% der maximalen.

Für das 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“<sup>2)</sup>.

Es sind auch Wasserstoffakzeptoren (z. B. Azetaldehyd) für die Zymasegärung notwendig (Neuberg). — Antiseptika, wie Toluol, hemmen die Gärung in lebenden Hefezellen wie auch die von Trockenhefe sehr stark, nicht aber die Gärung im Hefepreßsaft<sup>3)</sup>.

### 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,

<sup>1)</sup> Euler u. Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 131, S. 179. 1923.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu Meyerhof: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 102, S. 185. 1918; vgl. auch Euler u. Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 133, S. 264. 1924.

<sup>3)</sup> Vgl. hierzu Buchner: Zymasegärung. Euler u. Kullberg: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 73, S. 85. 1911. Euler u. Johansson: Zeitschr. f. Chem. Bd. 85, S. 192. 1913; ferner Meyerhof: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 102, S. 185. 1918 und vor allem Dorner: Ebenda Bd. 81, S. 99. 1912.

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<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. halten. Das Filtrat wird bei 10—15 mm Hg auf ungefähr  $\frac{1}{20}$  des Ausgangsvolumens eingeengt. Das wirksame Co-Enzym wird durch Fällung mit der fünffachen Menge 95proz. Alkohol erhalten. 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-Azetat versetzt (zu Kochsaft aus 5 kg frischer Hefe wird etwa 200 g kristallisiertes Salz genommen);  $p_h$  etwa 6. (Das Co-Enzym wird durch Bleiazetat bei  $p_h$  6 nicht gefällt, dagegen im Filtrat bei  $p_h$  10, s. u.) 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 wird eine nochmalige Bleifällung mit möglichst wenig Salz vorgenommen und die Lösung durch Einengen im Vakuum wieder konzentriert.

Aus dieser Lösung wird die Co-Zymase zur weiteren Reinigung 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

<sup>1)</sup> Euler u. Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 131, S. 182. 1923; 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; vgl. ferner Euler u. Myrbäck: Ebenda Bd. 169, S. 102. 1927. Über Darstellung und Eigenschaften reiner Co-Zymase vgl. Euler u. Myrbäck: Ebenda Bd. 198, S. 218, 236. 1931.



der Niederschlag, und die Flüssigkeit färbt sich gewöhnlich bläulich, bei weiterem Zusatz von Baryt beginnt das weiße Bariumsilicowolframat auszufallen. Man fährt sehr vorsichtig so lange mit dem Barytzusatz fort, wie noch eine Fällung entsteht und die Flüssigkeit rotes Lackmuspapier eben bläut. Erhöht man die Alkalität, bis die Flüssigkeit Phenolphthalein rötet, so wird das Co-Enzym vollständig von dem Bariumniederschlag adsorbiert. Aus dem abfiltrierten Niederschlag wird das Barium durch Schwefelsäure entfernt<sup>1)</sup>.

Darstellung des Co-Enzyms nach Boysen Jensen. Abgepreßte obergärige Hefe<sup>2)</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 eingeengt.

Co-Zymase aus Muskelkochsaft nach Meyerhof<sup>3)</sup>. Die Muskeln von den Hinterbeinen 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 (Apozymase)<sup>4)</sup>.

Nach Meyerhof<sup>5)</sup> wird Hefemazerationssaft von Lebedew (siehe S. 212) 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 Co-

<sup>1)</sup> Über hochaktive Co-Zymase-Präparate vgl. Euler u. Myrbäck: Naturw. 1929. I 291.

<sup>2)</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. Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 177, S. 158. 1928 (Bestimmung der Co-Zymase), ferner Euler u. Myrbäck: Ebenda Bd. 184, S. 163. 1929.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 101, S. 165. 1917. Bd. 102, S. 3. 1918. Vgl. auch Euler u. Gard: Svensk. kem. tidskr. Bd. 40, S. 99. 1928 (Reinigung der Co-Zymase aus Muskel).

<sup>4)</sup> Zur Nomenklatur vgl. Neuberg u. Euler: Biochem. Zeitschr. Bd. 240, S. 244. 1931.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 101, S. 165 und Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 170, S. 367.

Fermentes ist es nach Harden<sup>1)</sup> vorteilhaft, die Gärfähigkeit auf Fruktose allein und mit geringen Mengen von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zu prüfen. Zusatz einer ganz geringen Menge von hexosediphosphorsaurem Natrium (vgl. S. 222) 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.

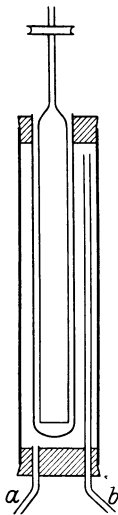


Abb. 72.

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 einem Beispiel von Euler und Myrbäck kamen auf 1 cm<sup>3</sup> Gärlösung (bestehend aus 0,2 g ausgewaschener Hefe in 5proz. Phosphatlösung von  $p_n$  6,3) 1 cm<sup>3</sup> Co-Enzymlösung. Glukosegehalt zu 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; die Lösung wurde zuerst mit CO<sub>2</sub> gesättigt; die entwickelte CO<sub>2</sub> 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 Mazerationssaft (durch Extraktion der getrockneten Hefe mit 3 Teilen Wasser bei 35—40° in 2 Std. dargestellt) wird in Kollodiumhülsen nach Sörensen dialysiert (Abb. 72). Eine breite Kollodiumhülse wird in ein Gefäß eingehängt, das mit destilliertem Wasser durchspült wird (Einfluß unten, Abfluß oben). Die Flüssigkeit innerhalb der Hülse 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.

Zur Messung der Co-Enzymwirkung bestimmten Euler und Karlsson<sup>4)</sup> die Gärungsgeschwindigkeit (cm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> pro Stunde, red. auf 0° und 760 mm), die durch Zusatz verschiedener Mengen

<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.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 123, S. 92. 1922.

gelösten Co-Enzyms zu einem Gemisch von getrockneter, gewaschener Hefe, Phosphat und Glukose (vgl. S. 216) hervorgehoben wird. 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 Verfahren in Frage. 1. Die Bestimmung des restierenden Zuckers (titrimetrisch und polarimetrisch) und 2. die Messung der entwickelten  $\text{CO}_2$ . Bei Gärungsversuchen im alkalischen Gebiet ist zu beachten, daß die  $\text{CO}_2$  als Bikarbonat oder Karbonat gebunden wird.



Abb. 73.  
Gärröhrchen.

Gravimetrische Methode zur Bestimmung der Kohlensäure nach Buchner. 20  $\text{cm}^3$  Hefesaft werden in einen 100- $\text{cm}^3$ -Erlenmeyerkolben gebracht, 0,2  $\text{cm}^3$  Toluol als Antiseptikum zugesetzt, dann 8 g Rohrzucker in mehreren Portionen, die in etwa 1 Minute durch gelinde kreisende Bewegungen gelöst werden. Die Flasche wird dann mit einem durchbohrten Gummistopfen, der ein Gärventil (das mit einem Bunsenschen Ventil versehen ist und eine kleine Menge starker Schwefelsäure enthält)

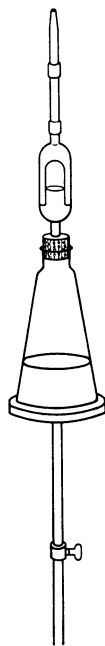


Abb. 74.

trägt, geschlossen (Abb. 74). Der ganze Apparat wird dann gewogen und der  $\text{CO}_2$ -Verlust zu bestimmten Zeiten durch mehrmalige Wägung festgestellt<sup>1)</sup>.

Meistens wird die Kohlensäure gasvolumetrisch gemessen. Die Messung in Schrötter- oder Einhorn-Saccharometern ist ungenau [Willstätter-Steibelt<sup>2)</sup>]. Das Gas wird meistens über Hg aufgefangen, doch dürfte mit  $\text{CO}_2$  gesättigtes Wasser, das mit einer Schicht Erdöl bedeckt ist, für die meisten Zwecke genügen.

Bestimmung nach Willstätter und Steibelt<sup>2)</sup>. Als Gäransatz dienten 20  $\text{cm}^3$  einer 5proz. Lösung von Glukose mit einer

<sup>1)</sup> Über eine Mikromethode von Widmark zur Bestimmung des Alkohols in geringen Flüssigkeitsmengen vgl. Prakt. II, S. 243. 1929.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 219. 1921. Zur qualitativen Prüfung der Kohlensäurebildung können Gärröhrchen von der Form Abb. 73 angewendet werden.

0,2 g trockener Hefe entsprechenden Menge frischer Hefe. Sättigung der Lösung mit  $\text{CO}_2$  bei der Versuchstemperatur, Anwendung von Nährstoffen (siehe S. 161), konstante Temperatur, gelindes Schütteln des Gärgefäßes. Die Halbgärmenge (siehe S. 226), der Kohlensäure bei Zimmertemperatur ( $20^\circ$ ) und 760 mm Druck beträgt  $144 \text{ cm}^3$ .

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 Azetamid 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.

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

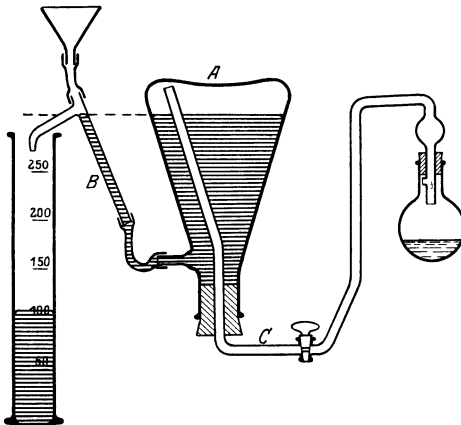


Abb. 75.

Drahtligatur verschlossenen Saugflasche A (siehe Abb. 75). 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 Hahnstопfen entfernt ist, mit dem Gärgolben verbunden. Der Druck ändert sich beim Auffangen der Kohlensäure be-

trächtliche Zeit nur wenig, später wird er durch Neigen des beweglichen Rohres *B* ausgeglichen.

Harden, Thompson 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 CO<sub>2</sub> gesättigt wurde. Das Quecksilberniveau im Vorratsgefäß wird durch einen Überlauf konstant gehalten, wie es aus der Abb. 76 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.

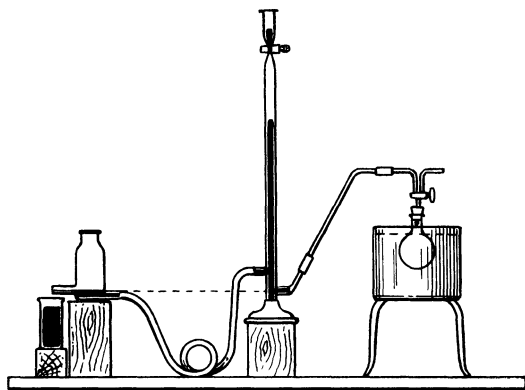


Abb. 76.

Um eine befriedigende Gärung zu erzielen, muß entweder reines sekundäres Phosphat ( $K_2HPO_4$ ) oder ein Gemisch von sekundärem und primärem Phosphat ( $KH_2PO_4$ ), dessen  $p_h$  nicht unter 6,3 liegt, angewendet werden. Auf jeden Fall ist die Lösung mit CO<sub>2</sub> zu sättigen. Da die bei der Gärung aus dem anorganischen Phosphat entstehende Hexosediphosphorsäure eine stärkere Säure als Phosphorsäure ist, so wird das entstehende Salz durch CO<sub>2</sub> in geringerem Grade unter Bildung von Bikarbonat zersetzt als das Phosphat. Daher wird ein Teil der vom zugesetzten Phosphat gebundenen Kohlensäure frei, und das beobachtete CO<sub>2</sub>-Volumen zu groß. Man kann eine Korrektur anbringen, indem man in Parallelversuchen das in Freiheit gesetzte CO<sub>2</sub>-Volumen vor und nach der Gärung durch Zusatz überschüssiger, mit CO<sub>2</sub> gesättigter

<sup>1)</sup> Harden: Alcoholic Fermentation. S. 28. London 1923.

Salzsäure bestimmt. Die Differenz der so in Freiheit gesetzten Volumina vor und nach der Gärung gibt die von der Zersetzung des Bikarbonats herrührende Menge, und diese muß von der bei der Gärung aufgefangenen Menge abgezogen werden<sup>1)</sup>.

Auch Euler und Josephson<sup>2)</sup> benutzen als Gäransatz die Vorschriften von Willstätter und Steibelt. Als Hefe dient Frischhefe (*Saccharomyces Marxianus*). Die Gärkölbchen befinden sich in Thermostaten von  $30^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$ . Sie enthalten 25 cm<sup>3</sup> Lösung mit einem Gehalt von 4<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Hexose, also im ganzen 1 g Zucker, ferner rund 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> PO<sub>4</sub> als gemischtes Phosphat von der Azidität  $p_n = 4,5$ . Die Hefemenge entspricht 0,2 g trockener Hefe. Das entwickelte CO<sub>2</sub> wird unter Schütteln

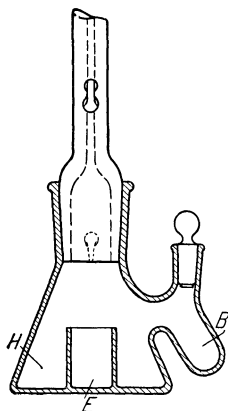


Abb. 77.

durch Kapillarröhren in fein geteilte Büretten geleitet und diese mit dem natürlichen Feuchtigkeitsgrad bei 17<sup>0</sup> und Atmosphärendruck gemessen. Die Halbgärmenge unter den geschilderten Bedingungen (17<sup>0</sup>, 760 mm) ist 136 cm<sup>3</sup>.

Bestimmung nach Warburg-Dorner<sup>3)</sup> und Meyerhof<sup>4)</sup> zugleich zur Methodik der Prüfung auf Co-enzymfrei ausgewaschene Hefe (vgl. S. 215). Als Apparate

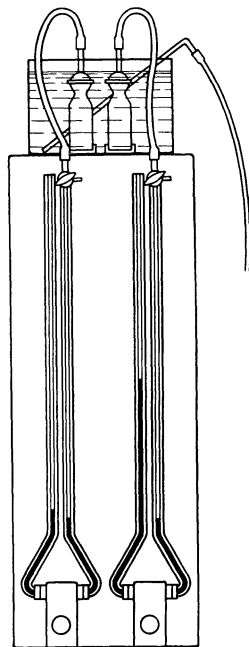


Abb. 78.

dienen Barcroft'sche Blutgasometer (Abb. 78). Am besten verwendet man Gefäße von der Form Abb. 77 (Rauminhalt etwa 13 cm<sup>3</sup>) oder Abb. 79 (Rauminhalt etwa 25 cm<sup>3</sup>). Die Länge der Manometerschenkel beträgt etwa 350 mm, der lichte Durchmesser der Manometerrohre 2—2,5 mm. Die entwickelte CO<sub>2</sub> wird durch die Druckzunahme gemessen, die eine bestimmte Menge

<sup>1)</sup> Nach Harden in Oppenheimer-Pincussen: Methodik der Fermente. S. 1228. Leipzig 1929.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 120, S. 42. 1922.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 81, S. 99. 1912. Vgl. auch Warburg: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 76, S. 331. 1911.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 102, S. 185. 1918.

Hefesuspension oder Preßsaft in einem Gäransatz in dem geschlossenen Raum des Apparates erzeugt. Als Sperrflüssigkeit wird die Brodiesche Lösung (vgl. S. 133) benutzt. Das eine Gefäß wird mit dem Gärgemisch beschickt, das andere, zur Temperatur- und Druckkontrolle, enthält ein gleiches Volumen Wasser. (Bei kurzdauernden Versuchen ist das Kontrollgefäß nicht unbedingt nötig.) Wenn die Gasentwicklung sofort nach einem bestimmten Zusatz beobachtet werden soll, so kommt das Hefegemisch in das zylindrische Gefäß, die zuckerhaltige, zuzusetzende Lösung in die taschenförmige Erweiterung (vgl. Abb. 79). Die Gefäße werden dann in das Wasserbad von 25° eingehängt, nach Temperatúrausgleich nach Schließen des Hahnes geschüttelt, der Druck durch Öffnen der Hähne wieder ausgeglichen, Schütteln und Öffnen mehrmals wiederholt, bis die Druckzunahme im Gärgefäß nicht mehr als 1—2 mm beträgt. Die Hähne werden dann geschlossen. Während der Beobachtung schüttelt man die Kolben von Zeit zu Zeit und liest den Druck ab. Sobald die Flüssigkeit in einem Schenkel das Ende der Teilung erreicht, wird der Hahn geöffnet, der Druck ausgeglichen und die Ablesungen wieder von Null an begonnen. Die Flüssigkeit im Gefäß muß mit CO<sub>2</sub> gesättigt sein. Die Kohlensäuremenge in Kubikmillimetern (0° 760 mm) wird nach der Formel berechnet:

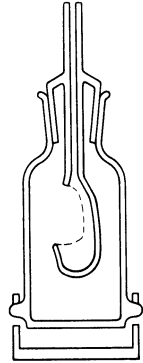


Abb. 79.

$$\text{CO}_2 = \frac{pv}{10000(1 + \alpha t)} + \frac{apF}{10000},$$

wo  $p$  die Druckzunahme in mm Manometerflüssigkeit (10000 = 1 Atmosphäre) bedeutet,  $v$  Volumen des Gasraumes der Gärungsgefäße in mm<sup>3</sup>,  $F$  angewandte Flüssigkeitsmenge in mm<sup>3</sup>,  $\alpha$  Absorptionskoeffizient für Kohlensäure in der Versuchsflüssigkeit (bei 25° = 0,76) bedeuten.

Bei den Untersuchungen von Meyerhof<sup>1)</sup> wurde der Hefemazerationssaft 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<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 102, S. 1. 1918.

<sup>2)</sup> Über eine Mikromethode zur CO<sub>2</sub>-Bestimmung bei Gärungsversuchen siehe Myrbäck u. Euler: in Oppenheimer-Pincussen: Die Methodik der Fermente. S. 1297.

Anmerkung: Darstellung der hexosephosphorsauren Salze.

1<sup>1)</sup>. Hexosediphosphat, Kalziumhexosediphosphat.  $C_6H_{10}O_4(PO_4Ca)_2 + H_2O$ , 400 g Rohrzucker, 83 g Mononatriumphosphat ( $NaH_2PO_4 + 2 H_2O$ ) werden in einer 8-l-Flasche in 2 l Wasser von 40° gelöst, mit 22 g Natriumbikarbonat zu einem  $p_h$  von 6,2—6,6 versetzt, dann werden 600 g Unterhefe in der Lösung verteilt. Nach Zugabe von 100 cm<sup>3</sup> Toluol wird das Gemisch unter häufigem Umschütteln bei 37° aufbewahrt. Sobald das gesamte Phosphat in organische Bindung übergeführt worden ist, wird der Prozeß unterbrochen. Man prüft das Verschwinden (oder die Verminderung) des anorganischen Phosphats in den einzelnen Proben so, daß man in je 2 cm<sup>3</sup> des Gemisches die Fermentwirkung durch Zufügen von 4 cm<sup>3</sup> 2,5proz. Ammoniak unterbricht, durch ein trockenes Filter gießt und 2 cm<sup>3</sup> des klaren Filtrats mit 3 cm<sup>3</sup> Magnesiamixtur versetzt. 5—7 Stunden nach Beginnen der CO<sub>2</sub>-Entwicklung erhält man keine Fällung mehr. — Das schwach saure Reaktionsgemisch wird dann mit ca. 2 n-NaOH gegen Lackmus neutralisiert, etwa 20 Minuten im siedenden Wasser erhitzt. Darauf wird zentrifugiert (oder filtriert). Das Zentrifugat enthält hauptsächlich hexosediphosphorsaures Natrium neben geringen Mengen eines Hexosemonophosphats. Die Trennung beider erfolgt auf Grund der verschiedenen Löslichkeit ihrer Erdalkalisalze. Die des Diphosphorsäureesters sind in kaltem Wasser mäßig, im heißen sehr schwer löslich; die des Hexosemonophosphats sind sowohl im kalten als auch im heißen Wasser leicht löslich. — Zur Isolierung des Hexosediphosphats wird das klare Zentrifugat in einem Rundkolben auf ca. 95° erwärmt und mit einer Lösung von 55 g wasserfreiem Kalziumchlorid (+ 108 g des Salzes  $CaCl_2 + 6 H_2O$ ) in 100 cm<sup>3</sup> siedendem Wasser gefällt. Man saugt möglichst heiß durch eine vorher angewärmte große Nutsche ab und wäscht mit wenig siedendem Wasser nach. — Zur ersten Reinigung wird der gesamte feuchte Niederschlag in ca. 500 cm<sup>3</sup> 2-n-Essigsäure unter Zusatz von 250 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Dann wird klar filtriert und mit 2 n-Natronlauge gegen Lackmus genau neutralisiert. Man erhitzt 15 Minuten in siedendem Wasserbad, saugt wieder möglichst heiß ab und wäscht mit wenig siedendem Wasser nach. Über weitere Reinigung s. u.

Die Darstellung des Bleisalzes des Hexosedi- und -monophosphats erfolgt nach Harden<sup>2)</sup> wie folgt: Festes Bariumazetat in einer dem

<sup>1)</sup> Darstellung nach Neuberg und Kobel in Oppenheimer u. Pincussen: l. c. S. 406.

<sup>2)</sup> Alcoholic Fermentation. S. 48.



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 Bariums Salze werden mit 10 Teilen kalten Wassers gewaschen, wodurch das Bariumhexosemonophosphat in Lösung geht. Der Rest wird mit 200 Teilen Wasser gewaschen, wodurch das Bariumhexosediphosphat gelöst wird. Die Hexosediphosphorsäure wird als Bleisalz durch Zusatz von Bleiazetat 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 Magnesiumazetat entfernbare. Die Bleifällung wird zweimal wiederholt. Man erhält das Salz von der Zusammensetzung  $(C_6H_{10}O_4PO_4)Pb_2$ . — Der erste wässrige Auszug, der das lösliche Bariumhexosemonophosphat enthält, wird mit basischem Bleiazetat 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 Quecksilberazetat 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.

Die Reinigung des käuflichen hexosediphosphorsauren Kalziums (Kandiolin) nach Neuberg und Sabetay<sup>1)</sup>. 10 g Kandiolin werden in 64 cm<sup>3</sup> 2 n-HCl 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> 2 n-NaOH tropfenweise hinzugegeben. Beigemengte Phosphate (und eventuelle Spuren von hexosediphosphorsaurem Kalzium) fallen dabei unlöslich aus, von letzterem jedoch nur wenig, da das Hexosediphosphat in kaltem Wasser löslich ist. Man saugt schnell ab, neutralisiert gegen Lackmus genau mit Salzsäure. Die klare Lösung wird dann auf dem Wasserbade bis auf 90° erhitzt, wobei sich das Kalziumhexosediphosphat in gut

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 161, S. 240. 1925. Vgl. auch Neuberg und Reinfurth: Biochem. Zeitschr. Bd. 146, S. 589. 1924 (Darstellung des Phenylhydrazinsalzes des Hexosephosphorsäureosazons aus hexose-monophosphorsaurem Barium).

filtrierbarer Form abscheidet. Dasselbe wird abgesaugt und auf der Nutsche mit heißem Wasser ausgewaschen. Wenn eine eisgekühlte Lösung in verdünnter Säure nach gehöriger Verdünnung und Neutralisation durch Ammoniak mit Magnesiamixtur keine Fällung mehr gibt, ist das Salz rein. Andernfalls muß die Prozedur wiederholt werden.

Eine lösliche Modifikation, die namentlich für enzymatische Studien sehr brauchbar ist, gewinnt man wie folgt (Neuberg und Sabetay: l. c.): Das reine hexosediphosphorsaure Kalzium wird in möglichst wenig verdünnter Milchsäure gelöst, mit Ammoniak unter Eiskühlung bis zur deutlichen Alkalität gegen 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 Ammoniumlaktat gewaschen. Dieses mit Alkohol und Äther gewaschene, an der Luft getrocknete Salz löst sich glatt in Eiswasser.

Aus der unlöslichen Modifikation des Kalziumsalzes 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 Kalziumverbindung 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 Kalziumoxalats neutralisiert man mit reinem Magnesiumoxyd. Man leitet  $\text{CO}_2$  ein, filtriert, gießt in die 4fache Menge absoluten Alkohol. Das Magnesiumhexosediphosphat fällt dabei als körnige Masse aus, die abgesaugt wird. Man reinigt durch Lösen in Eiswasser (zur Entfernung von Beimengungen von anorganischem Phosphat gibt man ein wenig Ammoniak zu; das anorganische Phosphat wird so in Ammoniummagnesiumphosphat übergeführt) und Fällern mit Alkohol.

2. Hexose-mono-phosphorsäure-ester. Darstellung nach C. Neuberg und J. Leibowitz<sup>1)</sup>. Das zur Aufarbeitung kommende Gärgut wird zunächst mit Natronlauge gegen Phenolphthalein genau neutralisiert, dann wird es in einen Rundkolben übergeführt und im lebhaft siedenden Kochsalzbade für einige Minuten belassen. Das ausgeschiedene Eiweiß wird abgeschleu-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 184, S. 491. 1927.

dert, das klare Zentrifugat durch Zusatz von hinreichend essigsaurem Kalzium oder Barium und Erhitzen von allem anorganischen Phosphat sowie von der Hauptmenge des Hexose-di-phosphorsäure-esters befreit. Es gelingt, beim Sieden im Kochsalzbade diese Salze praktisch vollständig niederzuschlagen. Man filtriert kochend heiß auf einer Saugnutsche. Das Filtrat wird nun mit Bleiessig ausgefällt, die Fällung abzentrifugiert, in den Zentrifugenbechern wiederholt mit Wasser gewaschen. Der Bleiessigniederschlag wird darauf in einem Porzellanmörser mit destilliertem Wasser zu einem dünnen Brei angerieben, die Suspension in eine Glasflasche übergespült, dann  $H_2S$  eingeleitet, dann das Filtrat von  $H_2S$  befreit, mit gesättigtem Barytwasser genau gegen Phenolphthalein neutralisiert, filtriert, das Filtrat im Faust-Heimschen Apparat auf ein kleines Volumen gebracht. In der eventuell filtrierten Flüssigkeit gibt normales Bleiazetat manchmal einen Niederschlag. Das Filtrat hiervon, bzw. das durch Bleiazetat nicht fällbare Konzentrat wird wieder mit Bleiessig ausgefällt und wie oben behandelt. Aus der gegen Phenolphthalein mit alkalifreiem Barytwasser zu neutralisierenden Lösung fällt Alkohol (Volumen 1:1) jetzt schon recht reines hexose-monophosphorsaures Barium, das abgenutscht wird. — Was das Gärgut anlangt, so genügt es, den alternierenden Zusatz von Zucker und sekundärem phosphorsaurem Natrium so zu gestalten, daß im Gärkolben dauernd ein deutlicher Überdruck besteht und beim Schütteln ununterbrochen Kohlensäure entweicht. Die besten Resultate liefern Säfte mit kurzer Inkubationszeit, d. h. mit schnellem Vergärungsbeginn, aber nicht zu großem Vergärungsvermögen. Bei den Hefesäften aus untergäriger Bierhefe (nach Lebedew) dauerte die Operation bis zum Abbruch des Versuchs nach erfolgter Angärung gewöhnlich 2 Stunden. Alle Prozeduren wurden dabei bei  $20-21^{\circ}$  vorgenommen. — 1 l Hefenmazerations-saft und 200 g Zucker sowie  $120\text{ g Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{ H}_2\text{O}$  lieferten über 60 g des Bariumsalzes.

Darstellung durch Hydrolyse des Hexosediphosphats mit Säuren nach Neuberg<sup>1)</sup>. — Bei der Darstellung des Kalziumsalzes ( $C_6H_{11}O_5 \cdot PO_4Ca + H_2O$ ) durch Hydrolyse mit Oxalsäure werden 9,5 g kristallisierte Oxalsäure in  $150\text{ cm}^3$  warmem Wasser gelöst und noch heiß mit 13,7 g festem, hexosediphosphorsaurem Kalzium versetzt. Man erhitzt dann auf dem Babo-Blech  $\frac{1}{2}$  Stunde. Man neutralisiert zunächst mit kohlen-saurem Kalk, zum Schluß mit Kalziumhydroxyd, wobei ein Überschuß davon durch sofortiges Einleiten von Kohlensäure unschäd-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 88, S. 432. 1918.

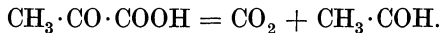
lich gemacht wird. Das Filtrat der gut ausgewaschenen Kalksalze wird bei 40° eingengt. Man läßt dann die, wenn nötig, mehrmals filtrierte Lösung unter beständigem Umrühren in dünnem Strahl in Alkohol einfließen. Dabei scheidet sich das in Wasser lösliche Kalziumsalz der Hexosemonophosphorsäure als gelbliches lockeres Pulver aus. Zur Reinigung löst man wieder in Wasser und fällt 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. 217 und 220) geschilderten Bedingungen nötig sind.

#### Karboxylase.

Die Karboxylase ist nach Untersuchungen von Neuberg und Mitarbeitern ein Teilferment der Zymase. Überall, wo Zymase vorkommt, findet sich auch die Karboxylase. Sie katalysiert den Zerfall der Brenztraubensäure in CO<sub>2</sub> + Azetaldehyd 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° inaktivierten Hefesäften.

Auch ausgegorene und inaktivierte Säfte zeigen Karboxylasewirkung, da die Karboxylase des Co-Ferments zu ihrer Wirkung nicht bedarf. Auch gegen Gifte ist die Karboxylase 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 1/10-n-Brenztraubensäurelösung eigen ist.)

Bestimmung: Als Enzympräparat können alle Hefen und Hefepräparate dienen, die Zymase enthalten.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 115, S. 211 (219). 1921.

<sup>2)</sup> Vgl. Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 71, S. 1. 1915.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 299 (304). 1923.

Die Bestimmungsmethoden für die entwickelte Kohlensäure sind die gleichen wie die oben geschilderten  $\text{CO}_2$ -Bestimmungsmethoden.

Demonstration der Karboxylasewirkung nach Neuberg. Man mischt in einem Reagensglas  $15,0 \text{ cm}^3$   $0,1 \text{ mol}$ . Brenztraubensäure ( $0,88 \text{ g} = 0,7 \text{ cm}^3$  frisch rektifizierter Brenztraubensäure in  $100 \text{ cm}^3$  Wasser) mit  $1,5 \text{ cm}^3$  m-Dikaliumphosphatlösung ( $17,4 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$  in  $100 \text{ cm}^3$  Wasser) oder mit  $1,5 \text{ cm}^3$  2 m-Kaliumazetatlösung ( $19,6 \text{ g CH}_3\text{COOK}$  in  $100 \text{ cm}^3$  Wasser). Dann trägt man in kleinen Anteilen  $2 \text{ g}$  Trockenhefe oder Azetonhefe ein. Das gut durchgemischte Gemenge wird in ein Schrötter-Einhornsches Gärungsröhrchen eingetragen. Die Gärung ist gewöhnlich nach 1 Minute im Gange. Der neben der  $\text{CO}_2$  entstehende Azetaldehyd läßt sich oft an seinem charakteristischen Geruch erkennen. Um ganz sicher zu sein, treibt man von dem Gärgut unter Zusatz von kohlen-saurem Kalk, der die unveränderte Brenztraubensäure bindet, einige  $\text{cm}^3$  an einem Destillationsapparat mit wirksamem Kühler ab und fängt das Übergangene unter Eiskühlung auf. Aus dem Destillat fällt eine essigsäure Lösung von p-Nitrophenylhydrazin das Azetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon (eigelbe Kristalle, Schmp.  $128,5^\circ$ ) ab. Ferner ist die Reaktion nach Rimini (vgl. S. 231) charakteristisch<sup>1)</sup>.

#### Bestimmung des Azetaldehyds<sup>2)</sup>.

Prinzip: Der bei der Gärung entwickelte Azetaldehyd wird durch Zugabe von  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  gebunden<sup>3)</sup>. Darauf wird mit Wasserdampf der Aldehyd aus dem mittels Kalziumkarbonats zersetzten Aldehydsulfit-Doppelsalz abdestilliert. Zu dem Destillat, das zur Reinigung noch einmal destilliert wird, kommt Hydroxylamin-Schwefelsäure, wodurch das Oxim und freie Schwefelsäure entstehen. Die entstehende freie Säure wird mit  $n/10 \text{ NaOH}$  und Methylorange als Indikator titriert. Der Leerverbrauch der Hydroxylamin-Schwefelsäure an  $\text{NaOH}$  wird in einem Kontrollversuch ermittelt.

<sup>1)</sup> Vgl. auch Neuberg u. Kerb: Biochem. Zeitschr. Bd. 47, S. 404, 410. 1912; Neuberg u. Reinfurth: Bd. 89, S. 393. 1918.

<sup>2)</sup> Neuberg u. Gottschalk: Biochem. Zeitschr. Bd. 146, S. 164 u. 582. 1924. Vgl. auch Neuberg u. Reinfurth: Biochem. Zeitschr. Bd. 89, S. 365. 1918 und Neuberg, Hirsch u. Reinfurth: Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 307. 1920.

<sup>3)</sup> Für die Arbeiten mit  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  eignen sich am besten die Oberhefen, während für die empfindlicheren Unterhefen, Trockenpräparate, Enzym-lösungen das neutral reagierende unlösliche Kalziumsulfid günstiger ist. Auch bei der Untersuchung des Stoffwechsels von Mikroorganismen und tierischen Zellen ist die Abfangmethode mit Kalziumsulfid mit Vorteil zu verwenden.

Die Methode zeigt für die für tierische Organe in Betracht kommenden Mengen einen Verlust von etwa 9—10%.

Beispiele von Gäransätzen mit Sulfiten nach Neuberg. 1. Ansatz mit Dinatriumsulfit. 100 g Rohrzucker werden mit den Nährsalzen (1 g Ammoniumsulfat, 0,5 g Dinatriumphosphat, ein Kriställchen Chlorkalium und Chlormagnesium) in 500 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst, mit 10 g obergäriger Hefe bis zur gerade einsetzenden Gärung bei 34° digeriert. Dann wird eine Auflösung von 33 g Dinatriumsulfit in 500 cm<sup>3</sup> Wasser hinzugefügt und das Gemisch in einem Gefäß mit Gärverschluß (vgl. S. 217) aufbewahrt. Die durch den Zusatz von Sulfit unterbrochene CO<sub>2</sub>-Entwicklung setzt nach einigen Stunden wieder ein. — 2. Ansatz mit Kalziumsulfit<sup>1)</sup>. In einer Lösung von 17,1 g Rohrzucker (bzw. 18 g Hexose) und den Nährsalzen (s. o.) in 180 cm<sup>3</sup> Wasser wird die aus 12,6 g wasserfreiem Dinatriumsulfit frisch bereitete Menge neutralen schwefligsauren Kalziums suspendiert und mit 5 g Bierhefe versetzt. Bei 34° ist die Gärung nach 24 Stunden beendet.

Die Bestimmung des Azetaldehyds erfolgt nach Neuberg<sup>2)</sup> folgendermaßen: Nach Beendigung der Gärung wird das Gesamtvolumen der Maische genau festgestellt. 50—60 cm<sup>3</sup> des ursprünglichen Gärgutes werden in einem mit Eis gekühlten Meßzylinder mit so viel einer eisgekühlten 25proz. Chlorbariumlösung versetzt, wie dem Dinatriumsulfit äquivalent ist, das in dem bearbeiteten Gäransatz enthalten ist. Dadurch werden die nicht gebundenen schwefligsauren Salze beseitigt. Die nach Zugabe der Chlorbariumlösung erfolgte CO<sub>2</sub>-Entwicklung, die von einem Zerfall des durch doppelte Umsetzung von Natriumbikarbonat mit Chlorbarium gebildeten Bariumbikarbonats herrührt, kommt bald zum Stillstand. Eine Schaumentwicklung beseitigt man durch Zusatz von etwas reinem aldehydfreiem Weingeist. Nach 1/2-stündigem

<sup>1)</sup> Herstellung von Kalziumsulfit. C. Neuberg und E. Reinthurth: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 52, S. 1690. 1919. — Das frisch gefällte Kalziumsulfid stellt man am besten her durch doppelte Umsetzung von sekundärem, schwefligsaurem Natrium (100 g wasserfreiem oder 200 g wasserhaltigem Salz in 500 cm<sup>3</sup> Wasser) mit einer konzentrierten heißen Lösung von CaCl<sub>2</sub> + 6H<sub>2</sub>O (175 g). — Im ersten Augenblick fällt das schwefligsaure Kalzium gelatinös aus, wird aber beim Umrühren schnell pulverig. Man erhitzt dann noch 15 Minuten auf dem Wasserbade, saugt ab, und wäscht erst mit Leitungswasser, dann mit destilliertem Wasser chlorfrei. Wenn das als Ausgangsmaterial verwendete Dinatriumsulfit Glaubersalz enthält, so ist dem durch Wechselwirkung entstandenen Kalziumsulfid Gips beigemischt, der jedoch die Verwendung nicht stört. Das gut abgepreßte Salz wird am besten ein wenig feucht, aber unter Luftabschluß aufbewahrt. Es entspricht der Formel CaSO<sub>3</sub> + 2H<sub>2</sub>O.

<sup>2)</sup> Siehe Neuberg in Oppenheimer u. Pincussen: l. c. S. 1171.

Stehen unter Eiskühlung wird, am besten im Kühlschranks, filtriert. In dem spiegelklaren Filtrat befindet sich das lösliche Bariumsalz der azetaldehyd-schwefligen Säure. Eine gemessene Menge dieses Filtrats dient zur eigentlichen Aldehydbestimmung. Zu diesem Zweck wird in einen geräumigen Claisenkolben gefällter kohlen-saurer Kalk gebracht, dessen Menge auf die ursprünglich

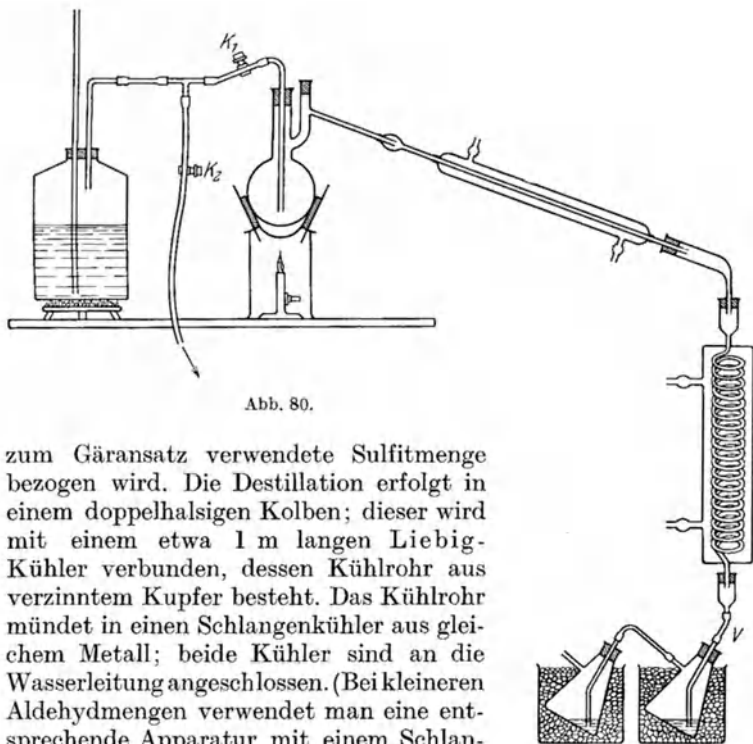


Abb. 80.

zum Gäransatz verwendete Sulfitmenge bezogen wird. Die Destillation erfolgt in einem doppelhalsigen Kolben; dieser wird mit einem etwa 1 m langen Liebig-Kühler verbunden, dessen Kühlrohr aus verzinnem Kupfer besteht. Das Kühlrohr mündet in einen Schlangenkühler aus gleichem Metall; beide Kühler sind an die Wasserleitung angeschlossen. (Bei kleineren Aldehydmengen verwendet man eine entsprechende Apparatur mit einem Schlangenkühler aus Glas.) Die Anordnung der in

Eis gekühlten Vorlagen *V* ist aus Abb. 80 ersichtlich. Vor Beginn des Versuches werden die Böden beider Saugflaschen mit einigen  $\text{cm}^3$  reinen Alkohols von 95% bedeckt, um den Aldehyd zurückzuhalten<sup>1)</sup>. Die Destillation selbst wird so vorgenommen, daß zunächst ein Drittel der im Claisenkolben vorhandenen Flüssigkeit auf dem Bismarck-Blech langsam über kleiner Flamme abdestilliert wird; dann wird Wasserdampf nach

<sup>1)</sup> Legt man zum Abfangen des Aldehyds etwas Ammoniak vor, so muß dieses vor der nachfolgenden Titration neutralisiert werden.

Regulierung der Klemmschrauben  $K_1$  und  $K_2$  durchgeleitet, der allen noch vorhandenen Aldehyd in die Vorlage überführt. Wenn in der Vorlage im ganzen etwa 700 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit angesammelt sind, kann die Destillation unterbrochen werden. Ein gesondertes Destillat von einigen cm<sup>3</sup> kann mit der Riminischen Reaktion (S. 231) auf Aldehydfreiheit geprüft werden. In einem aliquoten Teil des abgemessenen Destillates aus der Vorlage wird der Aldehyd mit Bisulfit und Jod<sup>1)</sup> oder mit Hydroxylaminsulfat (vgl. Beispiel S. 231) bestimmt.

Neuberg und Gottschalk fanden, daß die Azetaldehydmengen bedeutend ansteigen, wenn Insulin dem Gemisch von Leberbrei und sekundärem schwefligsaurem Kalk beigegeben wird. Hier sei das Verfahren unter Benutzung dieses Befundes (für Warmblüterorgane) mitgeteilt.

Es werden drei Ansätze gemacht. Der erste dient als Kontrolle. Durchschnittlich werden 33 g Leberbrei genommen, der in 100 cm<sup>3</sup> einer Tyrode-Phosphatlösung<sup>2)</sup> suspendiert wird. Die Phosphatlösung enthält 5,0 cm<sup>3</sup> m/3 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 2,0 cm<sup>3</sup> m/3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 100 cm<sup>3</sup>,  $p_h = 6,5$ . Dazu kommt 1 cm<sup>3</sup> Insulin (Brand), sowie 2 g frisch gefälltes Kalziumsulfat. Ansatz 2 und 3 enthalten die gleichen Bestandteile und außerdem noch 1 g des auf die Fähigkeit zur Aldehydbildung zu prüfenden Stoffes. Jeder der drei Ansätze wird gut durchgeschüttelt, in einen Brutschrank von 40° gestellt und des öfteren unter Lüften umgeschwenkt. Nach 2½ Std. wird zu jeder Portion noch 0,5 cm<sup>3</sup> 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 Kalziumkarbonat hinzugegeben. Mit 10 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O enthaltenden 25-cm<sup>3</sup>-Meßzylinder eintaucht. Diese Vorlage befindet sich in Eis, der Claisenkolben in einem Kochsalzbade. 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 Sulfhydrilverbindungen 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

<sup>1)</sup> Vorschrift nach Kolthoff (Maßanalyse. 2. Teil S. 432): Zu einer geeigneten Menge der Aldehydlösung setzt man etwa 30—50% mehr Bisulfitlösung (mit 5% Alkohol) zu, als stöchiometrisch erforderlich ist und läßt diese 15—30 Minuten einwirken. In einem anderen Kolben pipettiert man 25 cm<sup>3</sup> 0,1 n-Jod und gießt das Aldehyd-Bisulfitgemisch hinzu, um sofort mit 0,1 n-Thiosulfat zurückzutitrieren.

<sup>2)</sup> Zusammensetzung der Tyrode-Lösung: NaCl 8 g, KCl 0,2 g, CaCl<sub>2</sub> 0,2 g, MgCl<sub>2</sub> 0,1 g, NaHCO<sub>3</sub> 1 g (dann in der ursprünglichen Vorschrift NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 g, Glukose 1 g), dest. Wasser zu 1 Liter. Der ohne besondere Zusätze (z. B. Hexosephosphorsäure, d-Fruktose, d-Glukose) im überlebenden Gewebeprei auftretende Azetaldehyd ist auf präformiertes Glykogen zurückzuführen.



das  $\text{NH}_3$  abzufangen, das sich bei der stattfindenden Autolyse auch entwickeln kann, wird noch ein drittes Mal über  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (5 Tropfen einer 10proz. Lösung) destilliert.

Einige Tropfen des Destillates müssen sich mit 2 Tropfen frisch bereiteter kaltgesättigter Nitroprussidnatriumlösung und  $0,25 \text{ cm}^3$  3proz. Piperidins tiefblau färben (Azetaldehydreaktion nach Rimini).

Die Bildung von Azetaldehyd in den Gewebselementen 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  $\text{cm}^3$  0,9proz. NaCl-Lösung suspendiert. Nach Zusatz von 3 g frischgefälltem Kalziumsulfid ( $\text{CaSO}_3 + 2 \text{H}_2\text{O}$ ) und  $1 \text{ cm}^3$  Toluol oder Optochin<sup>2)</sup> (0,7 g) bleibt das gut umgeschüttelte Gemenge in einer mit Wattausch 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  $\text{cm}^3$  Tyrodephosphatlösung ( $p_h = 6,5$ ) + 2,0 g Kalziumsulfid; 5 Std. bei 40°.

Menge des gebildeten Azetaldehyds 1,37 mg. Derselbe Ansatz + 1  $\text{cm}^3$  Insulin, nach  $2\frac{1}{2}$  Std. Zusatz von weiteren 0,5  $\text{cm}^3$  Insulin.

Menge des gebildeten Azetaldehyds: 3,29 mg.

II.<sup>3)</sup> 1. Ansatz. 26 g Leberbrei (Meerschweinchen) + 100  $\text{cm}^3$  Tyrodephosphatlösung ( $p_h = 6,5$ ) + 1  $\text{cm}^3$  Insulin (Brand) und 2,0 g Kalziumsulfid, 40°.

Nach  $2\frac{1}{2}$  Std. Zugabe von 0,5 g Insulin. Nach 5 Std. Destillation über 5 g  $\text{CaCO}_3$ .

Redestillation über 5 Tropfen verd.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Redestillation über 0,3 g  $\text{PbCO}_3$ .

Vorlage 2  $\text{cm}^3$  Wasser, Destillat, 15,0  $\text{cm}^3$ .

Probe nach Rimini (im aliquoten Teil) ++.

12,0  $\text{cm}^3$  Destillat + 1,0  $\text{cm}^3$  2proz.  $(\text{NH}_2\text{OH})_2\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung,

Nach 60 Min. bei 30°.

Verbraucht  $0,17 - 0,07 = 0,10 \text{ cm}^3$  n/10 NaOH.

Azetaldehyd =  $0,10 \cdot 4,4 \cdot \frac{5}{4} = 0,55 \text{ mg}$ .

2. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g Glykogen. Aufarbeitung wie unter 1.

Destillat 15,0  $\text{cm}^3$  Probe nach Rimini ++++.

12,0  $\text{cm}^3$  Destillat + 1,0  $\text{cm}^3$  2proz.  $(\text{NH}_2\text{OH})_2\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung, nach 60 Min. bei 30°.

Verbraucht  $0,34 - 0,07 = 0,27 \text{ cm}^3$  n/10 NaOH.

Azetaldehyd =  $0,27 \cdot 4,4 \cdot \frac{5}{4} = 1,485 \text{ mg}$ .

3. Ansatz wie 1. mit Zugabe von 1 g  $\alpha$ -Alanin. Aufarbeitung wie unter 1.

Destillat 15,0  $\text{cm}^3$ . Probe nach Rimini ++++.

12,0  $\text{cm}^3$  Destillat + 1,0  $\text{cm}^3$  2proz.  $(\text{NH}_2\text{OH})_2\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung, 60 Min. bei 30°.

Verbraucht  $0,32 - 0,07 = 0,25 \text{ cm}^3$  n/10 NaOH.

Azetaldehyd =  $0,25 \cdot 4,4 \cdot \frac{5}{4} = 1,375 \text{ mg}$ .

<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 Kalziumkarbonat noch 5 g kristallisiertes Kalziumchlorid.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 146, S. 179. 1924.

### 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 Blut und in Organen<sup>1) 2) 3)</sup>.

Prinzip: Die Milchsäure wird mit Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung oxydiert, der gebildete Azetaldehyd abdestilliert, in einer Kaliumbisulfitlösung aufgefangen und jodometrisch bestimmt.

Die vorbereitende Enteiweißung erfolgt meist nach Schenck (vgl. S. 336), bei Blut, Plasma und Organextrakten ist jedoch auch die Enteiweißung nach Folin-Wu (vgl. S. 337) mit Natriumwolframat in schwefelsaurer Lösung zu empfehlen. Die Entzuckerung erfolgt nach Salkowski in kalziumhydroxydalkalischer Lösung mit Kupfersulfat (s. u.)<sup>4)</sup>.

Erforderliche Lösungen: 5proz. Sublimatlösung,

4proz. kochsalzgesättigte Salzsäure,

0,5proz. Schwefelsäure,

0,1 n-Permanganatlösung (3,2 g Kaliumpermanganat auf 1 l mit dest. Wasser. Hieraus durch Verdünnen eine  $1/500$  n-Permanganatlösung bereitet.

n/200-Jodlösung<sup>5)</sup>,

n/50-Bisulfitlösung.

1proz. Stärkelösung.

<sup>1)</sup> Hirsch-Kauffmann: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 140, S. 25. 1924. Vgl. hierzu Clausen: Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 276. 1923.

<sup>2)</sup> Embden: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 143, S. 297. 1925, ferner Lehnartz: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 179, S. 1. 1928.

<sup>3)</sup> Meyerhof: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 204, S. 305. 1924.

<sup>4)</sup> Über Vorbehandlung der Muskulatur nach Embden vgl. auch Praktikum II S. 237. — In manchen Fällen ist eine Extraktion der Milchsäure mit Amylalkohol angezeigt. (Vgl. Ohlsson: Skand. Arch. Physiol. Bd. 33, S. 231. 1916.)

<sup>5)</sup> Die Normalität der Jodlösung muß genau bekannt sein. Eine 0,1 n-Jodlösung wird hergestellt, indem man ca. 12,8 g festes Jod zusammen mit etwa 50 g Kaliumjodid in einen 1 l Meßkolben gibt und hierzu 50 bis 100 cm<sup>3</sup> Wasser. Dann erst füllt man auf 1 l auf. Die Einstellung der Jodlösung erfolgt mit einer entsprechend normalen Thiosulfatlösung, die ihrerseits gegen eine Kaliumjodatlösung eingestellt wird. Zur Herstellung von 0,01 n-Jodat löst man 0,3566 g Kaliumjodat in 1 l Wasser auf. Die bei Zusatz von KJ in schwach schwefelsaurer Lösung aus Jodat in äquivalenter Menge in Freiheit gesetzte Jodmenge dient in Gegenwart von Stärke zur Einstellung der Thiosulfatlösung.

Das Wasser zur Herstellung der Bisulfitlösung<sup>1)</sup> muß aus Jenaer Kolben mit eingeschliffenem Stopfen (ohne Gummiverbindung) über Baryt destilliert werden<sup>2)</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 kohlen säure- und metallspurenfreien Sulfitlösung, der gegen Jodlösung mit 1 proz. KCl-Stärke (vgl. S. 230) 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.

10 proz. Kupfersulfatlösung.

Kalkmilch, die aus 50 g fein pulverisiertem Kalziumoxyd und 200—220 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser hergestellt wird. Das CaO darf keine größere Menge Karbonat enthalten.

Ausführung<sup>3)</sup>: Die Muskeln werden unter Vermeidung jeder unnötigen Verletzung<sup>4)</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 Wäggläschen geworfen, das mit dem doppelten des dem Muskelgewicht entsprechenden Volumen 4 proz. 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 wie 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> 5 proz. Sublimat beendet. Nunmehr bleibt die Flüssigkeit unter öfterem Umschütteln etwa 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<sub>2</sub>S gefällt. Nach Abtrennung des Sulfidniederschlages

<sup>1)</sup> Eine 0,1 n-Kaliumbisulfitlösung wird hergestellt durch Auflösen von 6 g KHSO<sub>3</sub> (meta, Kahlbaum) auf 1 l Wasser.

<sup>2)</sup> Vgl. Meyerhof: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 188, S. 117.

<sup>3)</sup> Nach Hirsch-Kauffmann: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 140, S. 43. 1924. Ferner Lehnartz: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 179, S. 1. 1928.

<sup>4)</sup> Vgl. Meyerhof: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 182, S. 239. 1920.

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 cm<sup>3</sup>) in einen Meßkolben von 50 cm<sup>3</sup> pipettiert. Die Flüssigkeit wird mit 4 cm<sup>3</sup> 10proz. Kupfersulfatlösung versetzt und dann unter Verwendung von blauem Lackmuspapier als Indikator mit starker



Abb. 81.

Natronlauge annähernd neutralisiert<sup>1)</sup>, wobei kein Kupferhydroxyd ausfallen soll. Nunmehr werden 10 cm<sup>3</sup> 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

Molisch<sup>2)</sup>. Ein möglichst großer, genau gemessener aliquoter Teil des Filtrates 15—20 cm<sup>3</sup> — wird in einen Jenenser Kjeldahlkolben pipettiert<sup>3)</sup>, mit wenigen Tropfen 25proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gegen Lackmus neutralisiert und dann noch mit soviel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt, daß der Schwefelsäuregehalt der Flüssigkeit annähernd 0,5% beträgt.

Embden fügt noch 2 cm<sup>3</sup> einer 2proz. Manganosulfatlösung zu, um einen schädlichen Überschuß von Permanganat und damit eine Weiteroxydation des gebildeten Azetaldehyds zu verhindern<sup>5)</sup>. Als Vorlage dienen bei Milchsäuremengen von etwa 0,5 mg 10 cm<sup>3</sup> 0,02 n, bei solchen unter 0,2 mg 10 cm<sup>3</sup> 0,01 n-Kaliumbisulfatlösung. Die Vorlage wird gut mit Eis gekühlt.

Die Anordnung bei der Destillation ist aus der Abb. 84 ersichtlich. Empfehlenswert ist die Anwendung von Glasschliff-

<sup>1)</sup> Salkowski: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 3, S. 79. 1879. NaF-haltige Lösungen sind nach der Kupfer-Kalkfällung mindestens 3 Stunden oder über Nacht stehen zu lassen (Lipmann: Biochem. Zeitschr. Bd. 191, S. 442. 1927).

<sup>2)</sup> 0,5 cm<sup>3</sup> der Lösung mit 1—2 Tropfen einer 10proz. Lösung von reinem  $\alpha$ -Naphthol in reinem Alkohol, durchschütteln und unterschichten mit 1 cm<sup>3</sup> reiner konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Auftreten eines violetten Ringes bedeutet positiven Ausfall.

<sup>3)</sup> Im allgemeinen sind die Anteile des Schenck-Filtrates sowie des Kupfer-Kalk-Filtrates so bemessen, daß 0,5—2,0 mg Milchsäure zur Bestimmung gelangen.

<sup>5)</sup> Siehe auch Fußnote auf S. 236.

verbindungen (die Schiffe dürfen nicht eingefettet sein). Eine andere Anordnung zeigt Abb. 82<sup>1)</sup>.

Das Kapillarrohr, durch das man die Permanganatlösung zutropfen läßt, ist am unteren Ende U-förmig umgebogen; an dem

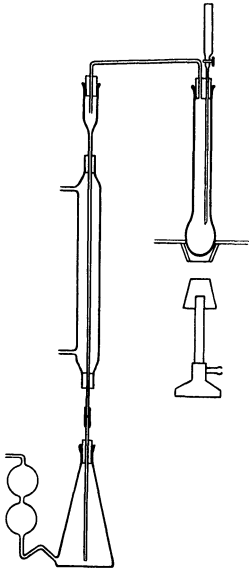


Abb. 82.

offenen Ende des U-Rohrs ist ein Sporn angeschmolzen, an dem die Tropfen der Permanganatlösung herabrinnen (s. Abb. 81.) Wie aus der Abb. 84 ersichtlich ist, kann man durch eine Zweiteilung statt Permanganat Wasser zutropfen lassen (so kann die richtige Tropfengeschwindigkeit ausprobiert werden). Der Vorratstrichter für das Wasser ist höher befestigt. — 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 wesentlicher Faktor

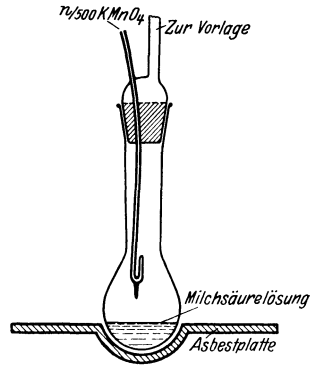


Abb. 83.

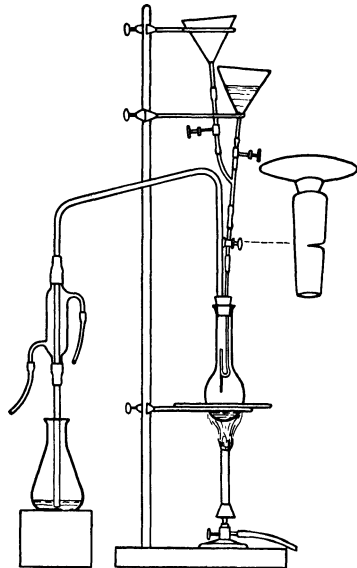


Abb. 84.

<sup>1)</sup> Nach Lohmann in Oppenheimer-Pincussen; Methodik S. 1272.

bei Milchsäureverlusten) zu vermeiden, wird der Destillationskolben von der Flamme durch ein Stück dicker Asbestpappe von etwa 20 cm im Quadrat getrennt (s. Abb. 83). 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 der Verwendung einer Flüssigkeitsmenge von 20 cm<sup>3</sup> den oberen Rand der Höhlung eben überragt.

Zur Erzielung von gleichmäßigem Sieden werden einige Tonstückchen in den Kolben gegeben. Die mit der Bisulfitlösung beschickte Vorlage wird mit dem Kühlrohr zunächst so verbunden, daß die ausgezogene Spitze nicht in die Bisulfitlösung taucht. Darauf füllt man die Kapillare des Tropftrichters mit doppelt destilliertem Wasser, verschließt den Glashahn, verbindet den Kjeldahlkolben mit dem Kühlrohr und entzündet den mit einem Schornstein versehenen Bunsenbrenner. Während des Anheizens füllt man den Tropftrichter mit 0,002 n-Permanganatlösung. Sobald der Dampf der siedenden Flüssigkeit die Luft aus dem Kolben, dem Glasrohr und dem erweiterten Teil des Kühlrohrs vertrieben hat (dabei wird das Destillationsrohr heiß), wird die Vorlage durch Gummistopfen luftdicht mit dem Kühlrohr verbunden; man taucht die Spitze des Kühlrohrs in die Bisulfitlösung ein. Dann öffnet man den Glashahn des Tropftrichters und läßt die Permanganatlösung tropfenweise zufließen. Zutropfen und Verdampfen sind so zu regulieren, daß das Flüssigkeitsvolumen im Kolben sich nicht ändert. Jeder Tropfen Permanganatlösung soll sofort entfärbt werden. Die Oxydation von 2 mg Milchsäure dauert etwa 30 Minuten, bei Mengen von weniger als 1 mg etwa 15—20 Minuten<sup>1)</sup>.

Man setzt das Zutropfen der Permanganatlösung so lange fort, bis der Kolbeninhalt braun gefärbt ist. Man erhitzt dann weiter unter beständigem Zutropfen von Permanganat noch 8—10 Minuten weiter, löst dann, ohne die Heizung abzustellen, die Vorlage vom Kühlrohr, so daß die Spitze des Rohrs nicht mehr in die Bisulfitlösung taucht, und kocht noch 1 Minute. Dann erst wird die Heizung abgestellt. Man spült das Rohr mit einigen Tropfen dest. Wasser von außen ab und titriert die Lösung nach 5—10 Minuten<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Darstellung im wesentlichen nach Lohmann in Oppenheimer u. Pincussen: l. c. S. 1273.

<sup>2)</sup> Bei der Oxydation der Milchsäure zu Azetaldehyd wird von Kendall und Friedemann: Journ. of biol. Chem. Bd. 80, S. LXI. 1928 statt KMnO<sub>4</sub> eine Suspension von MnO<sub>2</sub> empfohlen. Eine zu weitgehende Oxydation wird dadurch vermieden, namentlich wenn sehr geringe Milchsäure-

Die Bestimmung des gebildeten Azetaldehyds erfolgt in der Weise, daß zunächst das überschüssige Bisulfit durch Titration mit Jod beseitigt und dann diejenige Jodmenge bestimmt wird, die notwendig ist, um das bei der Spaltung der Azetaldehyd-Bisulfitverbindung durch Zusatz von Natriumbikarbonat oder sekundärem Natriumphosphat in Freiheit gesetzte Bisulfit zu oxydieren. Der größte Teil des überschüssigen Bisulfits wird durch 0,02—0,04 n-Jodlösung beseitigt und erst in der Nähe des Umschlagpunktes mit 0,002—0,0025 n, bei Milchsäuremengen von etwa 0,5 mg mit 0,005 n-Jodlösung bis zur eben erkennbaren Blaufärbung titriert. Zur Feintitration dient eine braune Mikrobürette von 5 cm<sup>3</sup>, die mit 0,01 cm<sup>3</sup> Teilung versehen ist und 0,002 cm<sup>3</sup> gut zu schätzen gestattet. Nach dem Umschlag setzt man 0,5—1 g Natriumbikarbonat zu, schüttelt kräftig und titriert langsam mit 0,005 bzw. 0,002 cm<sup>3</sup> Jodlösung bis zur erneuten Blaufärbung. Die Titration ist beendet, wenn erneuter Zusatz von Bikarbonat oder Phosphat die Blaufärbung wenigstens einige Minuten nicht wieder zum Verschwinden bringt. Die jetzt verbrauchte Zahl cm<sup>3</sup> Jodlösung dient zur Berechnung.

Berechnung: 1 cm<sup>3</sup> einer 0,0005 n-Jodlösung entsprechen 0,225 mg Milchsäure.

Der mittlere Fehler der einzelnen Bestimmung beträgt  $\pm 1,4\%$ , der des Mittelwertes  $\pm 0,4\%$ .

Glykolyse im lebenden Gewebe. Methode nach Warburg<sup>2)</sup>.

Prinzip: Die Glykolyse wird gemessen durch eine volumetrische CO<sub>2</sub>-Bestimmung in Barcroftmanometern. CO<sub>2</sub> wird in äqui-

mengen (weniger als 0,2 mg) zugegen sind und die Ergebnisse werden gleichmäßiger. Die Ausbeute ist dieselbe. — Die Darstellung des MnO<sub>2</sub> erfolgt so, daß man zu einer warmen alkalischen Lösung von KMnO<sub>4</sub> einen Überschuß von Glukose gibt (etwa 8 g Glukose und 50 g KMnO<sub>4</sub>, gelöst in einem Liter 0,5 n-KOH); schließlich wird ein Überschuß von KMnO<sub>4</sub> zugefügt. Die Lösung wird zur Vollendung der Reaktion auf dem Wasserbad erwärmt, dann wird gekühlt, der Niederschlag auf dem Buchnertrichter salzfrei gewaschen und in Wasser suspendiert. Die Suspension wird auf eine „Konzentration“ von etwa 0,1 n gebracht. Bei der Ausführung der Milchsäurebestimmung wird ein Überschuß der MnO<sub>2</sub>-Suspension zu dem lebhaft kochenden Reaktionsgemisch auf einmal hinzugegeben. Nach Friedemann, Cotonio und Shaffer: (Journ. of biol. chem. Bd. 73, S. 335. 1927) wird zur Beschleunigung der Milchsäureoxydation die Lösung mit 3 cm<sup>3</sup> einer ca. 10 n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (285 cm<sup>3</sup> konzentrierter Schwefelsäure auf 1 l), die MnSO<sub>4</sub> in 0,5 molarer (10<sup>0/0</sup>) Konzentration enthält, versetzt.

<sup>1)</sup> Über die Bestimmung der Milchsäure nach Mendel-Goldscheider vgl. Praktikum II, S. 240.

<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.

molekularen Mengen durch die entstehende Milchsäure aus Bikarbonatlösung in Freiheit gesetzt.

Herstellung von Gewebsschnitten: Die Herstellung der Schnitte<sup>1)</sup> geschieht mit einem mit Ringerlösung<sup>2)</sup> befeuchteten 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 mit Ringer gefüllte Glasschale (Petrischale) 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>3)</sup>.

a) Die Apparatur (Wasserthermostat, Schüttelvorrichtung, Manometer und der Trog) ist aus Abb. 85 und 86 ersichtlich. Über Ermittlung der Gefäßkonstante (vgl. S. 133). — In zwei Tröge I und II, deren Volumen um nicht mehr als 10% differieren

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 323. 1923.

<sup>2)</sup> „Ringerlösung für Glykolyse“: 100 cm<sup>3</sup> NaCl, 2 cm<sup>3</sup> KCl, 2 cm<sup>3</sup> CaCl<sub>2</sub> und 20 cm<sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (die dem Serum der betreffenden Tierart 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 Stambikarbonatlösung 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>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 330. 1923. Die Messung wird hier wie in c) (vgl. S. 240) unter aeroben Bedingungen gemessen unter der Voraussetzung, daß die Atmung in beiden Trögen I und II gleich groß ist. Da diese Voraussetzung nicht zuzutreffen braucht, wird auf die Bestimmung c) hingewiesen.



soll, bringt man je einen Gewebsschnitt. In dem Troge I befinden sich  $0,5 \text{ cm}^3$  Ringerlösung, in dem Troge II  $0,5 \text{ cm}^3$  einer Ringerlösung, der pro Liter  $2 \text{ g}$  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  $5 \text{ Vol.}\%$   $\text{CO}_2$  und  $95 \text{ Vol.}\%$  Sauerstoff (oder

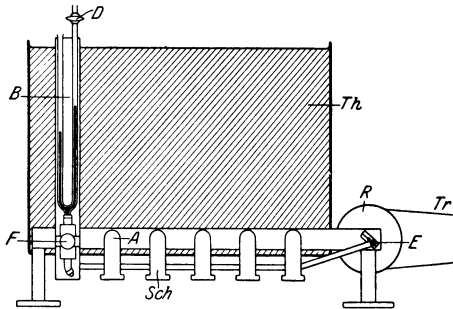


Abb. 85. *Th* Wasserthermostat, *B* Barcroftmanometer, *Sch* Schüttelvorrichtung, *R* Triebrolle, *Tr* Treibriemen.

$5 \text{ Vol.}\%$   $\text{CO}_2$  und  $95 \text{ Vol.}\%$  Luft oder  $5 \text{ Vol.}\%$   $\text{CO}_2$  und  $95 \text{ Vol.}\%$   $\text{N}_2$ ) gefüllt und Gewebsschnitte und Lösungen durch Schütteln mit dieser Gasmischung ins Absorptionsgleichgewicht gebracht. Die Druckänderung im Trog I =  $H_I$  (Verbrauch an Atmungs- $\text{O}_2$ , Bildung von Atmungs- $\text{CO}_2$ , Bildung von Säuren aus unbekanntem Substanzen) dient dazu, um den Nullpunkt für die in Trog II auftretende Druckänderung festzustellen. Die Druckänderung im Trog II =  $H_{II}$  ist außer durch dieselben Umstände wie im Trog I 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  $0,004 \text{ mg}$  Milchsäure äquivalent. Die

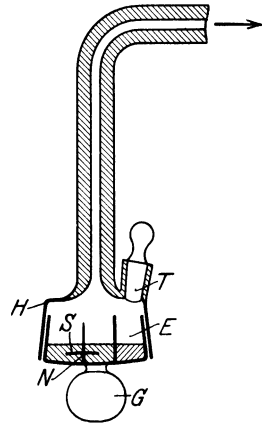


Abb. 86. Atmungstrog, der durch den Helmschliff *H* mit dem Barcroftmanometer verbunden wird. *G* ist ein massiver Glasgriff, der zum Eindrehen des Troges in den Helmschliff dient. *N* ist eine feine, auf den Boden des Troges aufgeschmolzene Glasnadel, die den Gewebsschnitt *S* faßt. *E* ist ein Einsatz.

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° resultiert.

b) 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 Bikarbonat 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  $h$ , in mm Brodie, ist und  $k_{CO_2}$  die Gefäßkonstante bei 5% CO<sub>2</sub> und 95% N<sub>2</sub> (S. 133) darstellt. Als Maß für die Größe der Spaltung bezogen auf die Zeit und die Menge der Substanz (mg) gilt die Gleichung

$$Q_{CO_2}^{N_2} = \frac{\text{mm}^3 \text{ Extrakohlensäure gebildet in Stickstoff}}{m \text{ mg Gewebe} \times \text{Stunden}}$$

(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<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>-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<sub>2</sub> zur Versorgung der Zellen mit dem zur Atmung notwendigen Sauerstoff.

c) Glykolyse unter aeroben Bedingungen<sup>2)</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 Bikarbonat durch die Milchsäure

<sup>1)</sup> Warburg: Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 317, 1923; Minami: Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 334. 1923.

<sup>2)</sup> Warburg: Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 53 (1924).

ausgetriebenen  $\text{CO}_2$ . Es bezeichnet  $x_{\text{O}_2}$  die Druckänderung durch Sauerstoff (in  $\text{mm}^3 = h_{\text{O}_2} \cdot k_{\text{O}_2}$ ),  $x_{\text{CO}_2}$  die Druckänderung durch  $\text{CO}_2$  (in  $\text{mm}^3 = h_{\text{CO}_2} \cdot k_{\text{CO}_2}$ ) und  $\gamma$  das Verhältnis

$$\begin{aligned} & x_{\text{CO}_2} \text{ und} \\ & x_{\text{O}_2} \\ & h = h_{\text{O}_2} + h_{\text{CO}_2}. \end{aligned}$$

So bestehen nach Auflösen nach  $x_{\text{O}_2}$  und  $x_{\text{CO}_2}$  die Gleichungen:

$$x_{\text{O}_2} \text{ (der veratmete Sauerstoff)} = h \left[ \frac{k_{\text{CO}_2} \cdot k_{\text{O}_2}}{k_{\text{CO}_2} + \gamma k_{\text{O}_2}} \right], \quad (1)$$

$$x_{\text{CO}_2} \text{ (die gesamte in Freiheit gesetzte Kohlensäure)} = h \left[ \frac{k_{\text{CO}_2} \cdot k_{\text{O}_2}}{\frac{k_{\text{CO}_2}}{\gamma} + k_{\text{O}_2}} \right]. \quad (2)$$

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:

$$\gamma = \frac{K_{\text{CO}_2} \cdot k_{\text{CO}_2}}{K_{\text{O}_2} \cdot k_{\text{O}_2}} \cdot \frac{H K_{\text{O}_2} - h k_{\text{O}_2}}{h k_{\text{CO}_2} - H K_{\text{CO}_2}}. \quad (3)$$

Mit Hilfe dieser 3 Gleichungen kann die Aufgabe, Atmung und Glykolyse in Gegenwart von Sauerstoff zu messen, gelöst werden.

Man benutzt 3 Gefäße (Abb. 87) von ungefähr gleichem Inhalt  $A$ ,  $B$  und  $C$ . Ihr Rauminhalt einschließlich Manometerkapillare bis zum Meniskus der Sperrflüssigkeit beträgt 12—13  $\text{cm}^3$ . Der Stopfen  $St$  ist bis zum Beginn der Manometerkapillare mit festem hochschmelzendem Paraffin überzogen. Die Gefäße  $A$  und  $B$  dienen zur Bestimmung von  $\gamma$ ,  $x_{\text{CO}_2}^{\text{O}_2}$

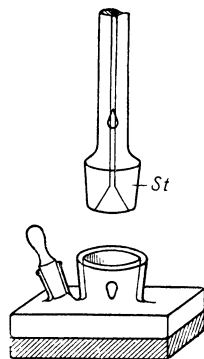


Abb. 87.

und  $x_{\text{O}_2}$ . In Gefäß  $A$  kommen 3  $\text{cm}^3$ , in Gefäß  $B$  8  $\text{cm}^3$  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 Gasmischung 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 auf der Mikrowage gewogen.

Hat  $a$  mg Gewebe in Gefäß  $A$  die Druckänderung  $h$  hervor gebracht 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 hervor gebrachten 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:

$$Q_{O_2} = \frac{\text{mm}^3 \text{ verbrauchten Sauerstoffs}}{\text{mg Gewebe} \times \text{Stunden}} \text{ (Atmung),}$$

$$Q_{CO_2} = \frac{\text{mm}^3 \text{ Extrakohlensäure, gebildet in O}_2}{\text{mg Gewebe} \times \text{Stunden}}.$$

(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 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:

$$\begin{aligned} H &= \text{beobachtete Druckänderung,} \\ H_{CO_2} &= \text{Druckänderung für CO}_2, \\ H_{O_2} &= \text{„ „ O}_2, \\ K_{CO_2} &= \text{Gefäßkonstante für CO}_2, \\ K_{O_2} &= \text{„ „ O}_2. \end{aligned}$$

Die beobachtete Druckänderung  $H$  setzt sich aus den Druckänderungen für CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> 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:

$$x_{O_2} = \frac{K_{O_2} \cdot k_{O_2} (K_{CO_2} \cdot H - k_{CO_2} \cdot h)}{K_{CO_2} \cdot k_{O_2} - K_{O_2} \cdot k_{CO_2}} \quad \dots I)$$

Durch analoge Ableitung folgt:

$$x_{CO_2} = \frac{K_{CO_2} \cdot k_{CO_2} (h \cdot k_{O_2} - H \cdot K_{O_2})}{K_{CO_2} \cdot k_{CO_2} - K_{O_2} \cdot k_{CO_2}} \quad \dots II)$$

### 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 Karzinomzelle fast vollständig hemmt. Die aerobe Glykolyse ist also in Blausäure ebenso groß wie die anaerobe.

Beispiel<sup>1)</sup>: Rattenkarzinom 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> Glukose, 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 Meniskus 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>
	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> in O <sub>2</sub>	V <sub>f</sub> = 3,0,
Volumina in cm <sup>3</sup>	V <sub>f</sub> = 8,00	V <sub>f</sub> = 3,00	V <sub>g</sub> = 10,7
	V <sub>g</sub> = 5,02	V <sub>g</sub> = 9,0	
Gefäßkonstanten	K <sub>O<sub>2</sub></sub> = 0,46	k <sub>O<sub>2</sub></sub> = 0,8	k <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 1,11
in mm <sup>2</sup> . . . . .	K <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 0,89	k <sub>CO<sub>2</sub></sub> = 0,96	
Schnittgewichte	7,10 mg	6,4 mg	6,82 mg
Druckändg. i. 15 Min.	H = + 69,5 mm	h = + 60,0 mm	h <sub>CO<sub>2</sub></sub> = + 52,5 mm
	Q <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>O<sub>2</sub></sup> = + 36	sehr groß Q <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>O<sub>2</sub></sup> = + 35	Q <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>N<sub>2</sub></sup> = + 34

<sup>1)</sup> Warburg, Posener u. Negelein: Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 338, Protokoll 8.

Beispiel (aerobe und anaerobe Glykose)<sup>1)</sup>  
 Rattenkarzinom  $Q_{O_2}$ ,  $Q_{CO_2}^{O_2}$  und  $Q_{CO_2}^{N_2}$   
 37,5<sup>o</sup>, Ringerlösung,  $CNaHCO_3 = 2,5-10^{-2}$ ,  
 0,2<sup>o</sup>/<sub>o</sub> Glukose, 5<sup>o</sup>/<sub>o</sub>  $CO_2$  ( $p_h = 7,66$ ).

Gasraum	5 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> $CO_2$ in $O_2$		5 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> $CO_2$ i. $N_2$
	Gefäß A	Gefäß B	Gefäß C
Volumina in $cm^3$	$V_f = 3$ $V_g = 10,54$	$V_f = 8$ $V_g = 5,07$	$V_f = 3$ $V_g = 9,28$
Gefäßkonstanten in qmm	$k_{O_2} = 0,93$ $k_{CO_2} = 1,09$	$K_{O_2} = 0,47$ $K_{CO_2} = 0,89$	$k_{CO_2} = 0,89$
Schnittgewichte Beobachtete	3,01 mg	3,32 mg	2,35 mg
Druckändg. in 15 Min.	$h = + 15$ mm	$H = + 15,5$ mm	$h_{CO_2} = 17,5$ mm
desgl.	$h = + 15$ mm	$H = + 14,0$ mm	$h_{CO_2} = 18,0$ mm
desgl.	$h = + 16$ mm	$H = + 14,5$ mm	$h_{CO_2} = 17,5$ mm
		$\gamma = - 3,65$	
		$Q_{O_2} = - 8,9$	$Q_{CO_2}^{N_2} = + 27,3$
		$Q_{CO_2}^{O_2} = + 23,7$	
Schnittgewichte Beobachtete	1,86 mg	1,71 mg	1,81 mg
Druckändg. in 15 Min.	$h = + 10,5$ mm	$H = + 12,0$ mm	$h_{CO_2} = + 16,0$ mm
desgl.	$h = + 10,0$ mm	$H = + 9,0$ mm	$h_{CO_2} = + 15,0$ mm
desgl.	$h = + 11,5$ mm	$H = + 11,0$ mm	$h_{CO_2} = + 16,0$ mm
		$\gamma = - 7,36$	
		$Q_{O_2} = - 4,05$	$Q_{CO_2}^{N_2} = + 33,8$
		$Q_{CO_2}^{O_2} = + 25,7$	

Um in ein und derselben Blutprobe die Glykolyse und die Atmung zu messen, verfuhr E. Negelein<sup>2)</sup> wie folgt. Defibriertes Blut wurde mit 5<sup>o</sup>/<sub>o</sub>  $CO_2$  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>3)</sup> aus der Druckabnahme am Manometer im Barcroft-Apparat, der Zuckerverbrauch nach Hagedorn-Jensen bestimmt. Für jede Einzelmessung genügte 1  $cm^3$  Blut, im ganzen also 6  $cm^3$  (Sauerstoffbindung ohne Blausäure, Zuckergehalt vorher und nachher ohne Blausäure und mit Bläusäure). Zur Zuckerbestimmung wurde

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 338, Protokoll 7.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 158, S. 131. 1925.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 69, S. 457. 1910.

1 cm<sup>3</sup> Blut vor der Enteiweißung mit 4 cm<sup>3</sup> Wasser lackfarben gemacht. Um den Sauerstoff- und Zuckerverbrauch auf die Gewichtseinheit trockener Zellschubstanz 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 = 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 wie 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 mit dem Bikarbonat 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.

Ausführlich behandelt Warburg die manometrische Messung des Zellstoffwechsels im Serum<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 Kubikzentimetern Lösungsmittel, wobei auch nicht gasförmige Stoffe, wie Bikarbonat, Milchsäure u. ä. als Säureäquivalentwasserstoff ausgedrückt werden: 1 Milligrammatom Säurewasserstoff = 22400 mm<sup>3</sup>. 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.

$\beta = 0,054 =$  Löslichkeit der CO<sub>2</sub> in mm<sup>3</sup> Lösungsmittel bei 1 mm Druck Brodie. Die Beziehung zwischen  $\alpha$  (Bunsenscher Absorptionskoeffizient und  $\beta$  ist:  $\beta = \frac{1000 \alpha}{10000}$ . — Für 38° und Serum

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 164, S. 481. 1925.

ist  $\alpha = 0,54$ ,  $\beta = 0,054 = \frac{\text{mm}^3 \text{CO}_2}{\text{cm}^3 \text{ Lösungsmittel} \times \text{Normaldruck}}$

$p = 470 = \text{CO}_2\text{-Druck in mm Brodie.}$

Enthält die Gasmischung  $a$  Prozent Kohlensäure, so ist

$p = (P - d) \frac{a}{100}$ , wo  $P$  der äußere Barometerdruck,  $d$  die

Dampfspannung der Versuchsflüssigkeit bei der Versuchstemperatur in mm Brodie ist. Für  $d$  wird für Serum (bei  $38^\circ$  und  $760 \text{ mm Hg}$ )  $630 \text{ mm}$  gesetzt.

$B = 460 = \text{Konzentration des Bikarbonats (mm}^3/\text{cm}^3\text{).}$

$p \cdot \beta = 25,4 = \text{Konzentration der freien CO}_2 \text{ (mm}^3/\text{cm}^3\text{).}$

$c = 485 = \text{Gesamtkonzentration an Kohlensäure (} p \cdot \beta + B \text{)}$

$[\text{H}^+] = 4 \cdot 10^{-8} = \text{Wasserstoffionenkonzentration (} = k \cdot \frac{p \cdot \beta}{B} \text{)},$  wo-  
bei ( $p_h = 7,4$ )  $k = 7,2 \cdot 10^{-7}$  ( $p_k = 6,14$ ).

$\rho = 0,0524 = \text{Dissoziationsrest der Kohlensäure (} \frac{p \beta}{p \beta + B} \text{)}$ .

Bildet sich im Serum  $\text{CO}_2$  oder Milchsäure, so wird ein Teil davon als Bikarbonat oder Laktat gebunden, entgeht also der gasvolumetrischen Messung, da für jedes undissoziierte Säuremolekül  $[\text{SH}]$  ein Molekül  $\text{CO}_2$  „retiniert“ wird, entsprechend den Gleichungen  $\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{S}' = \text{HCO}_3' + \text{SH}$  und  $\text{HM} + \text{S}' = \text{M} + \text{SH}$ , wo  $\text{S}'$  beliebige Säureanionen (ausgenommen Bikarbonation),  $\text{MH}$  die dem Serum zugefügte Milchsäure bedeuten. Die Zunahme dieser retinierten Säure pro Kubikzentimeter Serum bezeichnet Warburg als die Retention  $\Delta u = (\text{SH})/\text{cm}^3$  Serum und untersucht weiterhin die Abhängigkeit dieser Größe vom Druck  $p$  (ausgedrückt in Millimeter Brodie), also den Quotienten  $\Delta u/\Delta p$ , der im Falle der  $\text{CO}_2$  identisch ist mit dem Quotienten  $\Delta B/\Delta p$ . Es ergeben sich dabei Kurven, deren Verlauf leicht gekrümmt ist; bei  $5\%$   $\text{CO}_2$  ist der Quotient  $0,1$ , d. h.  $1 \text{ cm}^3$  Serum retiniert bei  $1 \text{ mm}$  Druckzunahme  $0,1 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2$ . Daraus ergeben sich ohne weiteres die neuen Gefäßkonstanten nach Art der früheren. Es ist nämlich  $x_{\text{CO}_2} = h_{\text{CO}_2} \cdot \left[ k_{\text{CO}_2} + v_F \left( \frac{\Delta u}{\Delta p} \right)_C \right] = h_{\text{CO}_2} \cdot k_{\text{CO}_2}^{\text{Serum}^*}$ , wobei  $\Delta u$  die Retention der  $\text{CO}_2$  im Serum und  $k_{\text{CO}_2}^{\text{Serum}}$  die neue Gefäßkon-

\* Man unterscheidet  $\left( \frac{\Delta u}{\Delta p} \right)_C$  und  $\left( \frac{\Delta u}{\Delta p} \right)_M$  je nachdem Kohlen- oder Milchsäure zu Serum hinzugefügt ist.



stante darstellt. Analog bei Milchsäure  $x_{\text{CO}_2} = h_{\text{CO}_2} \cdot \left[ k_{\text{CO}_2} + v_F \left( \frac{\Delta u}{\Delta p} \right)_M \right]$   
 $= h_{\text{CO}_2} \cdot k_M^{\text{Serum}}$ .

Die Berechnung der Retention ist an einem „Serummodell“ durchgeführt: eine Ringerlösung, die als retinierende Säure ein Dipeptid (in der Konzentration  $c'$ ) enthält. 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  $u$  ist (bei der Wasserstoffionenkonzentration  $[\text{H}^+]$ ) nämlich gemäß Definition des Dissoziationsrestes  $u = \varrho' \cdot c'$ , die Änderung  $\Delta u$  (bei der Änderung der Wasserstoffionenkonzentration durch Hinzufügen von Kohlensäure oder Milchsäure)  $= \Delta \varrho' \cdot c'$  ( $\varrho'$  = Dissoziationsrest des Dipeptids),  $\Delta \varrho'$  ist gleich  $\frac{H' + \Delta H}{H' + \Delta H + k} - \frac{H}{H + k}$  wo  $k$  die Dissoziationskonstante des Dipeptids ist.  $\Delta \varrho'$  in die obige Gleichung eingesetzt, ergibt die gesuchte Größe  $\Delta u$ . Die für Berechnung der Gefäßkonstanten weiterhin nötigen Größen  $(\Delta p)_C$  und  $(\Delta p)_M$  werden berechnet aus dem Dissoziationsrest  $\varrho$  der Kohlensäure und deren Konzentration  $c$ . Es bestehen nämlich die Beziehungen:  $\beta \cdot \Delta p = (\varrho_0 + \Delta \varrho) (c + \Delta c) - \varrho_0 c_0$ ,  $\beta \cdot \Delta p = c_0 \Delta \varrho + \varrho_0 \Delta c + \Delta \varrho \Delta c$ , wobei  $c_0$  und  $\varrho_0$  die Anfangskonzentration und den anfänglichen Dissoziationsrest bezeichnen,  $\Delta c$  und  $\Delta \varrho$  die Änderung pro  $\Delta p$ . Für  $(\Delta p)_C$  ergibt sich hierbei

$$(\Delta p)_C = \frac{\Delta u (\varrho_0 + \Delta \varrho) + c_0 \Delta \varrho}{\beta (1 - \varrho_0 - \Delta \varrho)} \quad \text{und für} \quad (**)$$

$$(\Delta p)_M = \frac{c_0 \Delta \varrho}{\beta (1 - \varrho_0 - \Delta \varrho) + \frac{k_{\text{CO}_2}}{v_F} (\varrho_0 + \Delta \varrho)} \quad (***)$$

Hat man  $(\Delta p)_C$  und  $(\Delta p)_M$  berechnet, so dividiert man  $\Delta u$  durch  $(\Delta p)_C$  und  $(\Delta p)_M$  und erhält so  $\left( \frac{\Delta u}{\Delta p} \right)_C$  und  $\left( \frac{\Delta u}{\Delta p} \right)_M$ , die mittlere Retention zwischen  $p_0$  und  $p_0 + \Delta p$ . Ist z. B. bei dem Serummodell  $c_0 = 485$ ,  $c' = 500$  (in  $\text{mm}^3/\text{cm}^3$ ),  $\varrho_0 = 0,0526$ ,  $\text{H}^+ = 4 \cdot 10^{-8}$ ,  $v_F = 8$  und  $k_{\text{CO}_2} = 0,907$  und steigt der Dissoziationsrest der Kohlensäure durch Zugabe von Säure um  $\Delta \varrho = 0,00373$ , dann ist  $\text{H}^+$  auf  $4,3 \cdot 10^{-8}$  gestiegen,  $\varrho'$  um  $0,0181$ . Daraus folgt nach den bisher abgeleiteten Gleichungen  $\Delta u = 9,05 \text{ mm}^3$ ,  $(\Delta p)_C$

$$= 45,5 \text{ mm, } (\Delta p)_M = 31,6 \text{ mm, } \left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_c = 0,20 \text{ für } \Delta p \text{ } 45,5 \left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M \\ = 0,29 \text{ für } \Delta p \text{ } 31,6.$$

Es ist leicht ersichtlich, daß  $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_c$  und  $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$  nicht konstant sind, sondern mit steigendem Kohlendruck  $h_{\text{CO}_2}$  kleiner werden. Doch ist die Änderung sehr klein und praktisch genügt es  $h_{\text{CO}_2} \sim \Delta p$  zu setzen.

Im natürlichen Serum kann das zu einem bestimmten Wert  $\Delta \varrho$  der Kohlensäure gehörige  $\Delta u$  nicht berechnet werden, weil die Konzentrationen der retinierenden Säuren und deren Dissoziationskonstanten nicht bekannt sind. Trotzdem läßt sich ein zusammenhängendes Wertepaar  $\Delta \varrho$  und  $\Delta u$ , wie folgt, bestimmen<sup>1)</sup>. Eine bekannte Menge einer starken Säure wird zu dem Serum gegeben, die auftretende Kohlensäuremenge ( $h \cdot k_{\text{CO}_2}$ ) wird gemessen. Die Menge der retinierten Kohlensäure erhält man, wenn man die aufgetretene  $\text{CO}_2$ -Menge von der zugefügten Säuremenge ( $s$ ) subtrahiert. Dieser Wert (bezogen auf  $\text{cm}^3$  Serum)  $\Delta u$  ist gleich  $\frac{s - h k_{\text{CO}_2}}{v_F}$ . — Sind Anfangsdruck der

Kohlensäure  $p_0$  und die Anfangskonzentration der Bikarbonate  $B_0$  bekannt, so kann das zu  $\Delta u$  gehörige  $\Delta \varrho$  berechnet werden. Durch diese Werte ist auch  $\varrho_0$  und  $C_0$  gegeben (vgl. S. 247). — Ferner ist nach Zugabe der Säure der Dissoziationsrest der Kohlensäure.

$$\varrho_0 + \Delta \varrho = \frac{(p_0 + h) \beta}{(p_0 + h) \beta + B_0 - \frac{h k_{\text{CO}_2}}{v_F}}$$

wo  $h$  die beim Ansäuern gemessene Kohlendruckzunahme ist. Aus letzter Gleichung ergibt sich

$$\Delta \varrho = \frac{(p_0 + h) \beta}{(p_0 + h) \beta + B_0 - \frac{h k_{\text{CO}_2}}{v_F}} - \frac{p_0 B}{p_0 \beta + B_0} \quad (*)$$

So erhält man alle Werte für die gesuchten Quotienten  $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_c$  bzw.  $M$ .

Bei der Ausführung der Bestimmung benutzt man drei Gefäße von der Form (Abb. 88)<sup>2)</sup>. (In den Gefäßen *I* und *II* wägt man in den Anhang auf der analytischen Wage etwa je  $0,2 \text{ cm}^3$  einer  $0,01 \text{ mol}$ . Weinsäurelösung ein und trocknet sie bei  $100^\circ$ . In Gefäß *I* kommen  $3 \text{ cm}^3$  bikarbonathaltige Ringerlösung, in Gefäß *II*

<sup>1)</sup> Vgl. Krebs in Oppenheimer-Pincussen: l. c. S. 655.

<sup>2)</sup> Vgl. Krebs: l. c. S. 656.

3 cm<sup>3</sup> Serum. Der Gasraum besteht aus 5 Vol.-% Kohlensäure in Stickstoff oder Sauerstoff. Gefäß *III* ist ein Thermobarometer und enthält 3 cm<sup>3</sup> Ringerlösung und das gleiche Gasgemisch wie die anderen Gefäße. Nachdem die Gefäße im Thermostaten geschüttelt und Gleichgewicht zwischen Gasraum und Flüssigkeit eingetreten ist, wird der Anhang von Gefäß *I* und *II* durch Neigen des Gefäßes mit dem Serum bzw. Ringerlösung ausgespült. Krebs macht darauf aufmerksam, daß man beim Herausnehmen der Manometer aus dem Thermostaten die obere Öffnung des linken Manometerschenkels mit der Fingerkuppe verschlossen halten muß, um zu verhindern, daß die Sperrflüssigkeit infolge der Abkühlung in das Versuchsgefäß angesogen wird. Man schüttelt dann im Thermostaten weiter, bis Gleichgewicht eingetreten ist. — Die Messung im Gefäß *I* ergibt die genaue Konzentration der Weinsäure. Sind  $h_I$  und  $h_{II}$  die im Gefäß *I* und *II* beobachteten Drucke,  $k_{CO_2}^I$  und  $k_{CO_2}^{II}$  die Gefäßkonstanten für Kohlensäure bei der Gefäße in Ringerlösung und  $m_I$  und  $m_{II}$  die in die Anhänge von Gefäß *I* und *II* gegebenen Mengen Weinsäurelösung, so ist die in *II* zu dem Serum hinzugefügte Säuremenge ( $s$ ) in mm<sup>3</sup>

$$s = h_I k_{CO_2}^I \frac{m_{II}}{m_I} \quad \text{und die Retention } \Delta u = \frac{s - h_{II} k_{CO_2}^{II}}{v_F}. \quad \text{Nun wird}$$

$B_0$ , die Konzentration der als Bikarbonat gebundenen Kohlensäure bestimmt (vgl. S. 246); dann berechnet man  $p_0$  (s. S. 246),

$$C_0 (= p_0 \beta + B_0), \varrho_0 \left( = \frac{p_0 \beta}{p_0 \beta + B_0} \right), \Delta \varrho \quad \text{nach Gleichung (*) (S. 248),}$$

indem man für  $h$  den im Gefäß *II* beobachteten Druck und für  $v_F$  und  $k_{CO_2}$  die Werte des Gefäßes *II* einsetzt. Aus diesen Werten erhält man nach Gleichungen (\*\*) und (\*\*\*) (s. S. 247)  $(\Delta p)_c$  und  $(\Delta p)_M$

und kann die gesuchten Quotienten  $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_c$  und  $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M$  bilden.

Wegen der Nebenreaktion, die z. B. ein Teil der entstehenden Milchsäure mit Serumbestandteilen eingeht (s. oben), 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:

$$Q_{O_2} = \frac{x_{O_2}}{m \cdot t}; \quad Q_{CO_2} = \frac{x_{CO_2}}{m \cdot t}; \quad Q_M \text{ (Größe der Glykolyse)} = \frac{x_M}{m \cdot t};$$

$$Q_S = \frac{x_M + x_{CO_2}}{m \cdot t},$$

wobei  $m$  mg Gewebe (Trockengewicht),  $t$  Stunden,  $x$  die entwickelte Menge  $\text{mm}^3$  Sauerstoff, Kohlensäure oder Milchsäure bedeuten.  $x_M$  und  $Q_M$  werden in  $\text{mm}^3$  ausgedrückt, wobei ein Milligrammatom Säurewasserstoff gleich  $22400 \text{ mm}^3$  sind. Um die gebildete Milchsäure in  $\text{mg}$  zu erhalten, ist  $Q_M$  mit  $4,02 \cdot 10^{-3}$  zu multiplizieren.

Bei der Messung der Glykolyse von Gewebsschnitten unter anaeroben Bedingungen durch Bestimmung der entstandenen Milchsäure wird das Gefäß (Abb. 87) benutzt. Dieses wird mit  $3 \text{ cm}^3$  traubenzuckerhaltiger Ringerlösung, dem Gewebsschnitt und mit Stickstoff mit  $5 \text{ Vol.}\%$   $\text{CO}_2$  gefüllt. Die Berechnung erfolgt nach der Gleichung  $x_M = h_{\text{CO}_2} k_{\text{CO}_2}$  oder wenn statt Ringerlösung Serum angewendet wird  $x_M = h_{\text{CO}_2} k_M$  (vgl. S. 247).

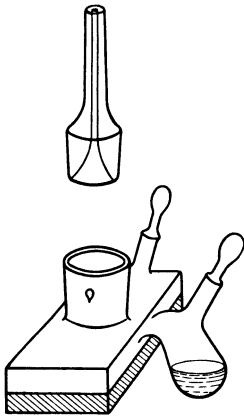


Abb. 88.

Bei der Messung der Glykolyse unter aeroben Bedingungen bestimmt man die Atmungsgröße ( $Q_{\text{O}_2}$ ) und die Gesamtsäurebildung ( $Q_s$ ), das ist die neugebildete Kohlensäure und die in der Glykolyse entstandene Milchsäure. Unter der Annahme, daß  $x_{\text{CO}_2} = -x_{\text{O}_2}$  folgt  $x_M$  (die Milchsäurebildung)  $= x_s + x_{\text{O}_2}$ . Ist jedoch die Glykolyse klein gegen die Atmung, so ist der durch diese Annahme bedingte Fehler groß und die Bestimmung der Glykolyse durch Bikarbonatbestimmung (s. u.) vorzuziehen.

Bestimmung der Atmungsgröße  $Q_{\text{O}_2}$ . In das Gefäß I (Abb. 87). (Rauminhalt einschließlich der Manometerkapillare bis zum Meniskus der Sperrflüssigkeit etwa  $13 \text{ cm}^3$ ) werden  $3 \text{ cm}^3$ , in das Gefäß II (von denselben Dimensionen)  $7 \text{ cm}^3$  glukosehaltige Ringerlösung, die mit dem angewendeten Gasgemisch (s. u.) gesättigt ist, gegeben. Ein drittes Gefäß mit einigen  $\text{cm}^3$  Ringerlösung dient als Thermobarometer. Dann kommt in beide Gefäße je ein Gewebsschnitt von etwa gleicher Größe (am besten zwei gleiche Hälften desselben Schnittes). Die Luft wird aus dem Gasraum in allen drei Gefäßen durch Sauerstoff mit  $5 \text{ Vol.}\%$   $\text{CO}_2$  verdrängt. Um ein Überkriechen der Flüssigkeit in die Manometerkapillare in Gefäß II mit  $v_p = 7 \text{ cm}^3$  zu verhindern, ist die Bohrung des Stopfens vor dem Versuch mit hochschmelzendem Paraffin zu überziehen.

Bei Anwendung der Formeln I und II (S. 243) sind die beobachteten Druckänderungen auf gleiche Schnittgewichte zu reduzieren.

Hat das Gewebe in Gefäß *I* mit *a* mg Gewicht *h* Druckänderung, das Gewebe im Gefäß *II* mit *b* mg Gewicht, die Druckänderung *H'* hervorgebracht, so berechnet sich  $H = H' \frac{a}{b}$ . — Durch Einsetzen von *h* und *H* in die Gleichung I und II (S. 243) erhält man  $x_{O_2}$  und  $x_{CO_2}$ . Nach Gleichung

$$Q_{O_2} = \frac{x_{O_2}}{m \cdot t}, \text{ d. h. } \frac{\text{mm}^3 \text{ verbrauchter Sauerstoff}}{\text{mg Gewebe} \cdot \text{Stunden}},$$

erhält man den Wert für die Atmungsgröße. Bestimmt man neben der aeroben Glykolyse gleichzeitig die anaerobe Glykolyse und bildet die Beziehung:

$$\frac{\text{anaerobe Glykolyse} - \text{aerobe Glykolyse}}{\text{Atmung}}, \text{ d. h. } \frac{Q_M^N - Q_M^{O_2}}{Q_{O_2}},$$

so erhält man den „Meyerhof-Quotienten“.

Bei der anaeroben Glykolyse eines Gewebsschnittes im Serum kann die durch die Milchsäure ausgetriebene Kohlensäure durch Bikarbonatbestimmungen ermittelt werden. Dabei wird die Abnahme des Bikarbonats in der Ringerlösung mit den erscheinenden Gasmengen verglichen<sup>1)</sup>. Zu diesem Zwecke werden 4 Gefäße (Abb. 89), 0, 1, 2, 3 verwandt, wovon Gefäß 0 in *R*, mit 1 cm<sup>3</sup> Ringerlösung beschickt, als Thermobarometer diene. Gefäß 1 wurde in *R* (Hauptraum) mit 1 cm<sup>3</sup> Ringerlösung beschickt, in *A* (Anhang) mit 0,2 cm<sup>3</sup> 4proz. Zitronensäure, Gefäß 2 wurde in *R* mit 1 cm<sup>3</sup> Ringerlösung beschickt und außerdem einem Gewebsschnitt, in *A* mit 0,2 cm<sup>3</sup> 4proz. Zitronensäure, Gefäß 3 wurde wie Gefäß 2 beschickt. Die so vorbereiteten Gefäße wurden mit 5% CO<sub>2</sub> in Stickstoff gefüllt und im Thermostaten bei 37,5° 10 Min. zwecks Temperatur- und Druckausgleich geschüttelt. Die Zeit, zu der der Ausgleich beendet war, ist gleich *t*<sup>0</sup>. — Bei *t*<sup>0</sup> wurde die Zitronensäure aus dem Anhänger *A* der Gefäße 1 und 2 in den Raum *R* eingekippt, wobei die CO<sub>2</sub>-Mengen (mm<sup>3</sup>) *B*<sub>1</sub> und *B*<sub>2</sub> im Gasraum erscheinen und manometrisch gemessen werden. Gefäß 3 wird eine passende Zeit, etwa 1 Std., weiterschüttelt, bis zur Zeit *t*, wobei der Druck *H* gemessen wird. Nach Ablesen von *H* wird die Zitronensäure

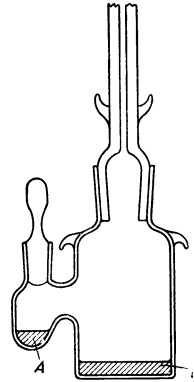


Abb. 89.

<sup>1)</sup> Negelein: Biochem. Zeitschr. Bd. 158, S. 127. 1925.

aus dem Anhang  $A$  des Gefäßes 3 in den Raum eingekippt, wobei die Kohlensäuremenge  $B_3$  erscheint. Es besteht die Beziehung

$$B_3^0 = B_1 - \frac{m_3}{m_2} (B_1 - B_2)^*,$$

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  $\text{CO}_2$ , (also  $x_M = B_3^0 - B_3$ ), 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  $x_M = \frac{h_0}{h} (B_3^0 - B_3)$ , wo  $h_0$  der Druck ist, der beim

Eintragen der Weinsäure<sup>1)</sup> in Ringerlösung entstanden wäre

$$\left( h_0 = \frac{\text{eingetragene Säure mm}^3}{k_{\text{CO}_2}} \right)$$

und  $h$  der Druck ist, der beim Eintragen der Säure im Serum entsteht. Der Faktor  $\frac{h_0}{h}$ , durch

den das Milchsäureverbindungsvermögen des Serums eliminiert wird, muß in jedem Falle besonders ermittelt werden und ist von der Größenordnung 1,2.

Nach dieser Anordnung wird die Glykolyse durch drei Bikarbonatbestimmungen 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 Zitronensäure und mißt die entwickelte Kohlensäure. Die Differenz, korrigiert für gleiche Schnittgewichte, ergibt die durch Milchsäure angetriebene Kohlensäure:  $x_{\text{CO}_2} = B_3^0 - B_3$ .

Beim Verfolgen der Glykolyse im Blut durch Feststellung der Zuckerabnahme verfahren Rona und Wilenko<sup>2)</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 Zuckerkonzentration bewirkt zunächst, bis zu etwa 0,5% eine Zunahme der absoluten Menge an zerstörtem Zucker. Bei noch

\*  $B' - B_2$  ist gleich dem Bikarbonatverbrauch vom  $m_2$  während der Ausgleichszeit minus der in  $m_2$  chemisch gebundenen Kohlensäure  $\cdot \frac{m_3}{m_2} (B_1 - B_2)$  dasselbe, umgerechnet auf das Gewicht  $m_3$ .

<sup>1)</sup> Z. B. auch Weinsäure, die bei 100° im Anhang des Gefäßes getrocknet wurde (vgl. S. 248).

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 62, S. 1. 1914.

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 Natriumazetat 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 Fundusmukosa von 10 Schweinemägen wird zerhackt und mit 6 l 0,5proz. Salzsäure 5 Tage lang bei 37<sup>0</sup> 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. Die-

<sup>1)</sup> Über Systematik der proteolytischen Fermente vgl. Oppenheimer: Die Fermente. S. 808. Nach neueren Untersuchungen Waldschmidt, Leitz: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 149, S. 211. 1925 und Graßmann: Handb. der Biochemie. 2. Aufl. Ergänzungsband S. 181ff. 1930, sind folgende Typen der proteolytischen Fermente zu unterscheiden:

Hauptgruppe der Proteinasen, zu denen die Pepsinasen, die Trypsinasen und als 3. Gruppe die Proteinase der Zellen und der pflanzlichen Säfte (Papain, Hefe-Proteinase, Kathepsin der tierischen Organe und Gewebe) gehören. Hauptgruppe der Ereptinasen (gegenüber Eiweißkörpern unwirksam, auf die Spaltung synthetischer oder durch Abbau gewonnener Peptidsubstrate eingestellt) zu denen folgende Fermentarten gehören: 1. die Dipeptidase, 2. die Amino-Polypeptidase, 3. die tryptische Carboxy-Polypeptidase, 4. die katheptische Carboxy-Polypeptidase.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 22, S. 233. 1896/97.

selbe 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 gesaugt. 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 Mukosa kann man noch einen großen Teil des darin gelösten Fermentes gewinnen, indem man die Mutterlauge der ersten Fällung mit basischem Bleiazetat 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 Ammonsulfat 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 Magen-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 Fleischmühle gemahlen. Beim Rinder- und Kalbsmagen wird die Drüsenschicht 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. Salz-

<sup>1)</sup> Hammarsten: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 108, S. 243. 1919, vgl. auch Z. physiol. Chem. Bd. 94, 291, 1915.



säure im Verhältnis von 10 Teilen Säure auf 1 Teil Schleimhaut behandelt und dann filtriert. Die Pferdemagenauszüge 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 0,2proz. Salzsäure gelöst, wozu längere Zeit nötig ist; man nimmt auf 1 l Auszug 150—200 cm<sup>3</sup> 0,2proz. Säure. Die klar filtrierte Lösung wird nochmals mit gesättigter NaCl-Lösung versetzt und der Niederschlag in 0,2proz. HCl gelöst. Man dialysiert gegen destilliertes Wasser, wobei eine gequollene Masse ausfällt, und trocknet im Exsikkator (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  $\frac{1}{2}$  n (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 0,2proz. 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 Exsikkator 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 0,2proz. HCl, dialysiert wieder, filtriert den entstandenen Niederschlag und trocknet, wie oben ausgeführt.

Zwecks Reinigung des Pepsins schlägt Forbes folgendes Verfahren vor<sup>1)</sup>, das darauf beruht, daß frisch gefälltes Aluminium-

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 71, S. 559. 1926/27.

hydroxyd das Pepsin sehr gut adsorbiert. Aus dem Adsorbat kann das Pepsin durch Lösen des Aluminiumhydroxyds in verdünnter Salzsäure befreit werden. — Künstlicher Magensaft wird, wie üblich, durch Digestion fein zerkleinerter Schweinemagenmukosa einige Tage lang in 0,4proz. HCl hergestellt. Dann wird durch ein dichtes Lager von Filterpapier filtriert. Das gelbe Filtrat ist vollkommen klar. Etwa 20 g des frisch gefällten und gewaschenen Aluminiumhydrats (Darstellung siehe Fußnote<sup>1</sup>) werden zu 4 l der Lösung zugefügt. Nach wenigen Stunden unter gelegentlichem Schütteln wurde die Flüssigkeit dekantiert und das Aluminiumhydroxyd abzentrifugiert. Dann wurde es in Kollodiumhülsen getan, und indem es einige Tage lang gegen 0,5proz. HCl dialysiert wurde, aufgelöst. Nachdem ein Rest von organischem Material abfiltriert wurde, wurde das Filtrat gegen Wasser weiter dialysiert, bis eine geringe Menge Präzipitat sich bildete. Dieses Präzipitat wurde abzentrifugiert, die Dialyse gegen Wasser wiederholt, bis eine mäßig große Menge eines Präzipitats abgetrennt werden konnte. Diese Fällung erreicht ihr Maximum bei ca.  $p_n$  3,5. — Zur weiteren Reinigung wird der Niederschlag in 0,2proz. Salzsäure gelöst und gegen große Mengen destillierten Wassers dialysiert. Eine geringe Menge der wirksamen Substanz wurde so niedergeschlagen, die Hauptmenge blieb aber in Lösung. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlages wurde das Ferment aus der Lösung mit geringen Mengen einer neutralen Bleiazetatlösung gefällt. Der Niederschlag wurde nach wenigen Stunden abzentrifugiert und in geringen Mengen einer gesättigten Oxalsäurelösung gelöst. Der Bleioxalat-Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde öfter gewechselt und die Dialyse so lange fortgesetzt, bis keine Oxalatspuren in der Pepsinlösung vorhanden waren. Die Lösung wurde bei Zimmertemperatur verdunstet, schließlich im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Während der Dialyse sind große Verluste an dem wirksamen Ferment zu verzeichnen.

Eine andere Methode der Reinigung des Pepsins beruht auf einer Fällbarkeit mit Safranin<sup>2</sup>). 20 g käufliches Pepsin wurde in 350 cm<sup>3</sup> dest. Wasser gelöst und etwa 50 cm<sup>3</sup> 1proz. Lösung von Safranin zugefügt. Das Pepsin wurde so quantitativ gefällt. Der

<sup>1</sup>) Darstellung des Aluminiumhydroxyds zur Fällung des Pepsins: 2 g AlCl<sub>3</sub> in 100 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser gelöst, werden in der Kälte mit konzentriertem Ammoniak gefällt. Das gefällte Aluminiumhydroxyd wurde zentrifugiert, mehreremal mit dest. Wasser gewaschen. Dies wurde zu der Pepsinlösung (10 g Pepsin in 150 cm<sup>3</sup> Wasser) gegeben und der Niederschlag zentrifugiert.

<sup>2</sup>) Vgl. Marston: Biochem. Journ. Bd. 17, S. 851. 1923.

Niederschlag wurde zentrifugiert, mehreremal mit Wasser gewaschen. Das Präparat (das in Salzsäure sehr schwer löslich ist) hat eine stark lösende Wirkung. — Zur weiteren Reinigung wurde der frische Pepsin-Farbstoffniederschlag unter Zentrifugieren wiederholt mit ca. 0,1% Farbstofflösung, dann mit destilliertem Wasser gewaschen: der Rückstand wird ohne zu trocknen in sehr schwacher Oxalsäurelösung in 20proz. Alkohol gelöst. Der Farbstoff kann bei wiederholter Extraktion mit Butyl- oder Isoamylalkohol (mit 10% Äther) fast vollständig entfernt werden. Wenn die Lösung des Farbstoffes vollkommen ist, so wurde der Isoamylalkohol durch wiederholtes Schütteln mit Äther (mit 10% Äthylalkohol) entfernt. Das Pepsin wurde aus der Lösung durch Hinzufügen des zweifachen Volumens eines Gemisches von gleichen Teilen Alkohol und Äther niedergeschlagen. Der optimale  $p_h$  für die Fällung scheint in der Nähe von 2,5 zu sein, entsprechend dem isoelektrischen Punkt des Fermentes. Das Ferment wird bei hoher Wasserstoffkonzentration durch Alkohol-Äther-Mischungen, nicht jedoch bei geringer H-Konzentration schnell inaktiviert.

Über Darstellung eines kristallisierten Pepsins vgl. Northrop<sup>1)</sup>.

### 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>2)</sup> wie folgt darstellt. Die in 0,5 cm breite Streifen geschnittenen Bänder werden einen Tag mit 1 proz. KOH digeriert, mit Wasser ausgekocht, 3 Tage in 1 proz. Essigsäure gelegt, nach nochmaligem Aufkochen einen Tag einer 5 proz. HCl bei Zimmertemperatur ausgesetzt. Nach gründlicher Wässerung wird dann im Soxhlet mit Alkoholäther extrahiert<sup>3)</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

<sup>1)</sup> Journ. of Gener. Physiol. Bd. 13, S. 739, 767. 1930.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 71, S. 320. 1911.

<sup>3)</sup> Vgl. auch Abderhalden u. Wachsmuth: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 71, S. 339. 1911.

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. Ein solche ist z. B. die Methode von Mett, der eine Hühnerereiweißlösung in Kapillaren aufzog, sie durch Kochen koagulierte und aus der Länge der verdauten Eiweißsäule auf die Fermentmenge schloß.

Methode nach Grützner<sup>1</sup>). Die Methode beruht darauf, daß Fibrin, welches mit Farblösungen (Karmin, 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. schwach ammoniakalischen Karminlösung bis zur dunkelroten Farbe gefärbt. Bei den Versuchen wird dieses Karminfibrin durch Auswaschen vom Glycerin befreit, mit der 5—6fachen Menge 0,1 proz. HCl übergossen, 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>2</sup>). Smorodinzew und Adowa<sup>3</sup>) benutzen zum Färben für einen Gewichtsteil des gut gewaschenen und ausgepreßten Fibrins vier Gewichtsteile der 5 promill. Glycerinlösung von Diphenylrosanilin (Zeresblau III, Spritblau-Bläulich, Bayer & Co.).

Methode nach Volhard und Löhlein<sup>4</sup>). Die Methode beruht darauf, daß reines, unverändertes Kasein in Salzsäure (0,1 proz.) gelöst durch Natriumsulfat vollständig gefällt wird. Bei fortschreitender Peptonisierung der Kaseinlösung nimmt die Azidität des Filtrates zu, wenn man die Verdauung der Kaseinlösung durch Aussalzen unterbricht und filtriert. Die durch das Na-

<sup>1</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.

<sup>2</sup>) Vgl. Hammarsten: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 74, S. 142. (152) 1911.

<sup>3</sup>) Smorodinzew und Adowa: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 149, S. 173. 1925.

<sup>4</sup>) Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 49; S. 2129; Hofmeisters Ber. Bd. 7, S. 120. 1906.

triumsulfat nicht mehr fällbaren salzsauren Peptone passieren das Filter und verursachen die Aziditätszunahme.

Ausführung: 100 g Kasein 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 Kaseinlösung 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 cm<sup>3</sup> auf und gibt dann unter Schütteln 100 cm<sup>3</sup> der beschriebenen Na-Kaseinlösung 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 bestimmende 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 Kasein in Flocken aus, während die entstandenen salzsauren Peptone bei der nun folgenden Filtration ins Filtrat gehen. Die Azidität von 100 oder 200 cm<sup>3</sup> des Filtrats wird durch Titration mit  $\frac{1}{10}$  n-NaOH bestimmt. Von der Gesamtazidität des Filtrats wird die ein für allemal bestimmte, auf ihre Konstanz von Zeit zu Zeit zu prüfende Azidität der Stammlösung subtrahiert; von der Restsumme ist der Säurewert des zugesetzten Magensaftes noch abzuziehen. Als Indikator dient Phenolphthalein. Die durch Titration gefundene Zunahme der Azidität ist durch die verwendete Anzahl cm<sup>3</sup> an Magensaft und die Anzahl Stunden der Verdauung zu dividieren und mit 4 zu multiplizieren, da nur ein Viertel der Gesamtmenge zur Titration benutzt wurde.

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.

<sup>1)</sup> Fuld und Levison: Biochem. Zeitschr. Bd. 6, S. 473. 1907.

## 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.

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. Gummiarabikumlösung (0,5 g Gummi, 0,01 g Sublimat auf 100 cm<sup>3</sup> Wasser).

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 127, S. 125. 1923.

Ausführung: Zu 10 cm<sup>3</sup> der Edestinlösung werden je 0,1 bis 1,0 cm<sup>3</sup> der zu untersuchenden Pepsinlösung 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 Gummiarabikumlösung 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 konstanten und möglichst reinen Pepsins (Armourpepsin) eine Untersuchungsreihe hergestellt.

Beispiel: Reihe für eine 0,2 proz. Edestinlösung, 1/2-stündiger Verdauungsversuch bei 40°.

Pepsin in $\gamma = 10^{-3}$ mg Armourpepsin	20 % NaCl cm <sup>3</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 70 g + 100 cm <sup>3</sup> H <sub>2</sub> O cm <sup>3</sup>
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 Rizinlösung aufzuhellen, wird benutzt.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 53. 1906.

Erforderliche Lösungen: 1. 1 g Rizin (Vereinigte Chemische Werke Charlottenburg oder Merck) werden in 100 cm<sup>3</sup> 1,5 proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

2.  $\frac{1}{10}$  n-HCl.

3. Gekochter Magensaft.

4. Verdünnter Magensaft (1 cm<sup>3</sup> Saft wird mit 100 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> der Rizinlösung. Dann setzt man mit einer anderen Pipette zu jedem Glas 0,5 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$  n-HCl hinzu, worauf sich sämtliche Portionen stark trüben. Nun füllt man in das erste Gläschen 1 cm<sup>3</sup> der aufgekochten Fermentlösung, in das zweite 0,9, in das dritte 0,8, in das vierte 0,5 und in das fünfte 0 cm<sup>3</sup>. Dann bringt man von der Fermentlösung in Gläschen 1: 0 cm<sup>3</sup>, in 2: 0,1 cm<sup>3</sup>, in 3: 0,2 cm<sup>3</sup>, in 4: 0,5 cm<sup>3</sup> und in 5: 1,0 cm<sup>3</sup>, so daß in jedem Reagensglas insgesamt 3,5 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit enthalten sind. Hierauf werden die Gläser zugekorkt und 3 Stunden in den Brutschrank gestellt. Es wird festgestellt, bei welcher Verdünnung das Gemisch eine vollkommen klare Lösung darstellt.

Methode nach L. Michaelis und Rothstein<sup>1)</sup>. Zum Nachweis der Fermentwirkung wird die Aufhellung eines durch Sulfosalizylsäure 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. Sulfosalizylsäure-Eiweißlösung. Menschliches Blutserum mit Wasser 12fach verdünnt oder Hammelserum 15fach verdünnt wird mit 10 proz. Sulfosalizylsäurelösung unter Umrühren versetzt, bis Kongopapier eben violett gefärbt wird; eine eben deutliche Violettgefärbung 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 Sulfosalizylsäure beträgt  $\frac{2}{3}$ — $\frac{3}{4}$  der Menge des jeweils angewandten unverdünnten Serums.

2. 10 proz. 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: Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 155. 1920.



**Ausführung:** In eine Reihe von Reagensgläsern werden je  $1\text{ cm}^3$  der Fermentlösung in verschiedenen Verdünnungen mit je  $5\text{ cm}^3$  der Sulfosalizylsäure-Eiweißmischung gebracht, ebenso wird  $1\text{ cm}^3$  der Kontrollfermentlösung mit  $5\text{ cm}^3$  der Eiweißmischung vermischt. Die Gläschen werden dann in ein Wasserbad von  $38\text{--}40^\circ$  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  $1,0; 0,8; 0,64; 0,52\text{ cm}^3$  eingefüllt, mit Wasser auf  $1,0\text{ cm}^3$  aufgefüllt und dazu je  $5\text{ cm}^3$  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 versetzt, etwa eine Woche bei Zimmertemperatur belassen, 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  $\frac{1}{100}$  geteilt, auf Ausblasen geeicht, außen abtupfen, mehrmals Aufsaugen und Ausblasen). Diese 100fache Verdünnung ist die Vergleichslösung; sie muß jedesmal frisch bereitet werden.

**Methode von Groß<sup>1)</sup>.** Aus einer sauren Kaseinlösung wird durch Zusatz von essigsaurem Natrium das Kasein gefällt; die Abbauprodukte des Kaseins bleiben in Lösung.

**Erforderliche Lösungen:** 1. 1 promillige saure Kaseinlösung.  $1,0\text{ g}$  Caseinum puriss. nach Hammarsten wird mit  $16\text{ cm}^3$  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 der Pepsin-

<sup>1)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 13, S. 643.

lösung beschickt, wobei die nötigen Verdünnungen mit destilliertem Wasser hergestellt werden können. Dann werden zu jedem Gläschen  $10\text{ cm}^3$  der Kaseinlösung (zweckmäßig vorher auf  $39\text{--}40^\circ$  anwärmen) zugegeben und die ganze Reihe wird auf 15 Min. in ein Wasserbad von  $38\text{--}40^\circ$  gesetzt und dann das unverdaut gebliebene Kasein durch einige Tropfen konzentrierter Na-Azetatlösung ausgefällt. Man bestimmt die geringste Menge an Magensaft, die in 15 Min. alles Kasein verdaut hat.

Berechnung: Als Pepsineinheit gilt diejenige Menge Magensaft, die noch imstande ist,  $10\text{ cm}^3$  Kaseinlösung in 15 Min. so zu verdauen, daß auf Zusatz der Natriumazetatlösung keine Trübung mehr auftritt und berechnet hieraus die Zahl der Einheiten für  $1\text{ cm}^3$  Magensaft. Fand man z. B., daß  $0,025\text{ cm}^3$  Magensaft  $10\text{ cm}^3$  Kasein noch völlig verdauten, so enthält der Magensaft

$$\frac{1}{0,025} = 40 \text{ Einheiten. (Normal sind } 30\text{--}50 \text{ Einheiten.)}$$

Methode nach Sörensen<sup>1)</sup>. Auch die Methode, deren sich Sörensen bei seinen Arbeiten über das  $p_h$ -Optimum des Pepsins bediente, beruht auf der Ausfällung des unverändert gebliebenen Eiweißes. Er benutzte Azidalbumin als Substrat und fällte mit einer Gerbsäure- oder Stannochloridlösung; im Filtrat wurde dann der Stickstoff bestimmt.

Erforderliche Lösungen: 1. Azidalbuminlösung, 1,25 proz.  $1600\text{ cm}^3$  einer neutralen, etwa 4proz. Lösung von reinem Hühnereiweiß werden mit  $2640\text{ cm}^3$  Wasser und  $800\text{ cm}^3$  n-HCl versetzt und die Mischung 22 Std. bei  $37^\circ$  gehalten. Dann werden  $30\text{ cm}^3$  5 n-Salzsäure und 4 Std. später noch  $50\text{ cm}^3$  5 n-HCl hinzugefügt, wonach die Mischung noch 23 Std. bei  $37^\circ$  aufbewahrt wird.

2. Pepsinlösung z. B. 4 g Pepsin in  $500\text{ cm}^3$  0,01 n-HCl (von Sörensen wurde Pepsin „Langebek“ benutzt).

3. n-Natriumazetat.

4. 0,1 n-NaOH.

5. 15 proz. Gerbsäurelösung oder nach Hedin<sup>2)</sup> 100 g Gerbsäure, 50 g NaCl, 50 g Natriumazetat,  $50\text{ cm}^3$  Eisessig auf 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ .

Oder 6. eine Stannochloridlösung<sup>3)</sup>. 50 g Zinn werden in rauchender HCl gelöst unter Zugabe von 1 Tropfen gelösten Platinchlorids. Das Ganze wird bis zu  $130\text{ cm}^3$  eingedampft, auf 1 l Wasser verdünnt und filtriert.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 288. 1909.

<sup>2)</sup> Hedin u. Masay: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 100, S. 263. 1917.

<sup>3)</sup> Schjerning: Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 37, S. 416. 1898.

**Ausführung:** Für jeden Versuch wurden 360 cm<sup>3</sup> Azidalbuminlösung, 50 cm<sup>3</sup> Pepsinlösung und 40 cm<sup>3</sup> einer passenden Mischung von n-NaOH mit dest. Wasser (zur Herstellung der verschiedenen H-Ionenkonzentrationen) vermischt. Die Pepsinlösung wird nach Vorwärmen der Versuchsflüssigkeit, die im Wasserbad von 37 bis 37,1<sup>0</sup> stand, zugegeben. Zu bestimmten Zeiten und nach unmittelbar vorhergehendem Umschütteln werden Proben von je 30 cm<sup>3</sup> entnommen, die in eisgekühlte 100-cm<sup>3</sup>-Kolben eingegossen werden, in denen 2 cm<sup>3</sup> Natriumazetatlösung und die zur Neutralisation der vorhandenen Salzsäure erforderliche Menge Natronlauge in einem Gesamtvolumen von 40 cm<sup>3</sup> vorgegeben sind. Die Kolben für die Stannochloridproben enthalten außerdem noch CaCl<sub>2</sub> (15 cm<sup>3</sup> 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.

**Methode nach Rona und Kleinmann<sup>1)</sup>.** Prinzip: Der Grad der Trübung eines Serum-Sulfosalizylsäuregemisches 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 Grübler 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 Azidität. Die Mischung wird mit physiologischer Kochsalzlösung auf 75 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. In gleicher Weise

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 478. 1923.

wird ein zweiter Versuch angesetzt. Beide Erlenmeyerkolben kommen nun in ein Temperierbad mit mechanischer Rührvorrichtung. Das Bad ist vorher auf  $40^{\circ}$  eingestellt. Außer den Versuchskölbchen kommen in das Temperierbad in Reagensgläsern 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 so viel 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 Bechergläser von je etwa  $75 \text{ cm}^3$  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 Bechergläsern werden je  $5 \text{ cm}^3$  z. B.  $\frac{1}{10}$  n-NaOH einpipettiert. Diese Natronlauge dient dazu, um  $5 \text{ cm}^3$  der Eiweißlösung, die zur Festlegung eines Messungspunktes im Verlauf der Spaltung dem Gemisch entnommen werden, 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  $\frac{1}{100} \text{ cm}^3$  geteilten Pipette aus beiden Erlenmeyerkölbchen zweimal je  $5 \text{ cm}^3$  entnommen und je  $4,85 \text{ cm}^3$  von diesen in je ein Becherglas einpipettiert. Die rückbleibenden  $0,15 \text{ cm}^3$  werden verworfen. In die Bechergläser werden  $0,15 \text{ cm}^3$  destilliertes Wasser gegeben. In die zurückbleibenden  $65 \text{ cm}^3$  Eiweißlösung werden nunmehr unter Schütteln des Kolbens  $2 \text{ cm}^3$  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  $5 \text{ cm}^3$  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  $7 \text{ cm}^3$  den  $p_n$ .

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> 25 proz. HCl und 8 cm<sup>3</sup> 20 proz. Na-Sulfosalizylatlösung versetzt, leicht umgeschüttelt, und nach 3 Minuten im Nephelometer untersucht (vgl. Nephelometrie S. 37).

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> 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 Kasein<sup>2)</sup>. Die Trübung wird hier mit Chinidin hydrochlor. dargestellt. Die Methode wird ausführlich beim Trypsin (S. 314) geschildert.

#### Viskosimetrische Bestimmung der Pepsinwirkung.

Holster<sup>3)</sup> hat zum Studium der ersten Stadien der peptischen Kaseinverdauung die Änderung der Viskosität benutzt, die eine Kaseinlösung während der Fermentwirkung aufweist. Die Auslaufzeit (vgl. S. 42) nimmt in der allerersten Verdauungsphase ab und erreicht schnell ein flaches Minimum, um dann rasch anzusteigen und unter Vervielfachung der ursprünglichen Auslaufzeit ein scharfes Maximum zu erreichen, das durch die Koagulation der ganzen Kaseinlösung gegeben wird. Nur der erste Teil der Kurve (die also die erste Verdauungsphase wiedergibt) die Gegend des Minimums und des darauffolgenden Viskosi-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 150, S. 444. 1924.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 155, S. 34. 1925.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 196, S. 1. 1931.

tätsanstieges ist genau reproduzierbar. Als Substrat wurde eine 3proz. Kaseinlösung benutzt;  $p_h$  etwa 2,3; Verdauungstemperatur  $30^{\circ}$ . Die Viskositätsmessung wurde im Ostwaldschen Viskosimeter vorgenommen (vgl. S. 42). Zur Verfolgung der peptischen Spaltung wurde außerdem die Titration in Azeton nach Linderstrøm-Lang (vgl. S. 269 und S. 312) benutzt.

Die Pepsinkonzentration des Verdauungsgemisches soll so gewählt werden, daß die Werte der Ausflußzeit das brauchbare Kurvenstück in etwa 2—8 Stunden durchlaufen.

In neuerer Zeit haben Sörensen, Katschioni-Walther und Linderstrøm-Lang<sup>1)</sup> genaue Vorschriften zum Studium der peptischen Eiweißspaltung gegeben, die im wesentlichen hier wieder gegeben werden sollen. Als Substrate wurden benutzt 1. Kaseinlösung (6 g Kasein-Hammarsten, aufgeschlemmt in  $64 \text{ cm}^3$  Wasser und durch Zutropfen von  $36 \text{ cm}^3$  0,1 n-NaOH unter gutem Umrühren gelöst). 2. Gliadinlösung (6 g Gliadin aus Weizenmehl wurden in  $90 \text{ cm}^3$  Wasser aufgeschlemmt und durch Zutropfen von  $10 \text{ cm}^3$   $\frac{1}{3}$  n-HCl unter gutem Umrühren gelöst). 3. Gelatinelösung (6 g Gelatine — Goldgelatine Schweinfurt — werden in  $100 \text{ cm}^3$  Wasser gelöst). — Pepsinlösung: 1 g Pepsin (Ph. Brit. Merck) wurde in  $100 \text{ cm}^3$   $\frac{1}{3}$  n-HCl bzw. für die Gliadinversuche in  $100 \text{ cm}^3$  0,1 n-HCl aufgelöst. — Die bei den Versuchen angewandten, vorher auf  $30^{\circ}$  erwärmten Mengen der Eiweißlösungen werden so schnell wie möglich in einer mit einem Stöpsel verschließbaren Flasche mit der Pepsinlösung vermischt, worauf man Proben von je  $10 \text{ cm}^3$  der Mischung entnimmt, und zwar sowohl gleich nach der Vermischung als auch nach der Aufbewahrung der Mischung bei  $30^{\circ}$  während der bei den einzelnen Versuchen angegebenen Zeiten. Die entnommenen Proben werden in Kolben abpipettiert, in welchen die Titrierung vorzunehmen war, und die den Stoff (Azeton, KOH, NaOH) enthalten, durch den die peptische Spaltung abgebrochen wird. Diese Kolben werden vor und nach der Abpipettierung gewogen<sup>2)</sup>, worauf die Titration möglichst bald stattfindet. Vor jeder Probeentnahme ist die Flasche gut zu schütteln und nur eine möglichst kurze Zeit offen zu halten.

Als Methoden wurden angewendet I. Die Formoltitration (vgl. S. 289). Die Untersuchung, ob eine kürzere Aufbewahrung mit der zur Abbrechung der peptischen Spaltung verwendeten Menge  $\frac{1}{5}$  n-NaOH einen Fehler bei der Titration verursachen könnte, ergab, daß noch nach 2stündigem Stehen der Zuwachs am

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 174, S. 251. 1928.

<sup>2)</sup> Über die Fehler, die entstehen, wenn die Proben nicht abgewogen, sondern abgemessen werden, vgl. l. c. S. 257.

Verbrauch von 0,1 n-NaOH noch innerhalb der Fehlergrenze der Titration liegt. II. Willstätter-Methode (vgl. S. 305). Die peptische Spaltung wird mit einer der anwesenden Salzsäure angepaßten Menge etwa 0,1 n-alkoholischen Kalilauge abgebrochen. Es werden dann 2 cm<sup>3</sup> Indikatorlösung (Phenolphthalein) und 40 cm<sup>3</sup> 90proz. kalter Alkohol zugesetzt und die Probe mit alkoholischer Kalilauge oder Salzsäure titriert, bis die Indikatorfarbe etwas stärker als die der Kontrollösung ist. Schließlich werden noch 100 cm<sup>3</sup> warmer Alkohol in dickem Strahl und unter gutem Umschütteln zugegeben, worauf die Titrierung bis zur Farbe der Kontrollösung zu Ende gebracht wird. Bei Versuchen mit Gelatine-lösung ist es notwendig, um eine verfrühte Ausscheidung eines Niederschlages zu verhüten, das mehr alkalisch liegende Thymolphthalein zu benutzen, bis zu ziemlich starker Indikatorfarbe zu titrieren und dann 140 cm<sup>3</sup> warmen Alkohol auf einmal zuzusetzen, worauf die Titrierung zu Ende geführt wird. Die Vorschriften zur Darstellung von etwa 0,1 n-alkoholischer Kaliumhydroxydlösung und von etwa 0,1 n-alkoholischer Salzsäure sind die folgenden: a) 30 g Kaliumhydroxyd werden in 250 cm<sup>3</sup> Wasser aufgelöst, die Lösung wird mit 3750 cm<sup>3</sup> 96proz. Alkohol gemischt. Nach gutem Umschütteln und mehrtägigem Stehenlassen wird die klare Lösung von ausgeschiedenem Kaliumkarbonat abgossen. b) 100 cm<sup>3</sup> etwa 2 n-Salzsäure werden mit 1900 cm<sup>3</sup> 96proz. Alkohol gemischt. — Die Kontrollösung (10 cm<sup>3</sup> Wasser + 2 cm<sup>3</sup> Indikatorlösung + 140 cm<sup>3</sup> 96proz. Alkohol wird auf schwach, aber deutlich rote bzw. grünlichblaue Farbe titriert, wozu 0,3—0,4 cm<sup>3</sup> 0,1 n-alkoholische Kalilauge nötig ist. — Man muß bestrebt sein, die Titration in solcher Weise auszuführen, daß möglichst wenig Niederschlag gebildet wird und daß sich dieser in der Flüssigkeit aufgeschlämmt hält, und erst in einem Zeitpunkt gebildet wird, wo die Probe nur wenige Tropfen der Titrierflüssigkeit erfordert, um die Farbe der Kontrollösung anzunehmen. III. Methode von Linderstrøm-Lang (vgl. S. 312). Bei der Spaltung der Kasein- und Gliadinlösungen wurde die Fermentwirkung mit 20 cm<sup>3</sup> Azeton abgebrochen. Nach Zugabe von weiteren 15 cm<sup>3</sup> Azeton und 10 Tropfen Naphthylrotlösung wurde mit etwa 0,1 n-alkoholischer Kalilauge auf die Farbe der Kontrollösung I (s. unten) titriert, worauf man 65 cm<sup>3</sup> Azeton in dickem Strahl und unter gutem Umschütteln zusetzt. Die Titrierung wird dann möglichst schnell durch Zutropfen von wenigen Tropfen der Kaliumhydroxydlösung bis zur Farbe der Kontrollösung II zu Ende gebracht.

Kontrollösung I (für Kasein und Gliadin): 10 cm<sup>3</sup> Wasser + 35 cm<sup>3</sup> Azeton + 10 Tropfen Indikatorlösung + 0,5 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$  n-

alkoholische Salzsäure. Kontrollösung II: Kontrollösung I + 65 cm<sup>3</sup> Azeton. — Selbst eine 2stündige Aufbewahrung des Verdauungsgemisches mit der zur Unterbrechung der peptischen Spaltung nötigen Azetonmenge verursacht keinen Fehler bei der Titration.

Bei Gelatinelösungen werden nach der Unterbrechung der peptischen Spaltung mit der vorhandenen Salzsäure angepaßten Menge etwa 0,1 n-alkoholischen KOH ( $a$  cm<sup>3</sup>), 10 cm<sup>3</sup> Azeton und 10 Tropfen Naphthylrotlösung<sup>1)</sup> zugefügt, und mit etwa 0,1 n-alkoholische Salzsäure auf die Farbe der Kontrollösung I (s. unten) titriert, worauf 90 cm<sup>3</sup> warmes Azeton in dickem Strahl und unter gutem Umschütteln zugesetzt werden; dann titriert man möglichst schnell auf die Farbe der Kontrollösung II.

Kontrollösung I (für Gelatine): 10 cm<sup>3</sup> Wasser +  $a$  cm<sup>3</sup> 90proz. Alkohol + 10 cm<sup>3</sup> Azeton + 0,5 cm<sup>3</sup> 0,1 n-alkoholische Salzsäure. — Kontrollösung II: Kontrollösung I + 90 cm<sup>3</sup> Azeton. Auch hier sind die Störungen, die durch die Niederschlagbildung verursacht werden, durch vorläufige Versuchsreihen auszuschalten.

### 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 anazide 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>2)</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

<sup>1)</sup> Lund empfiehlt bei der Azeton-Salzsäuretitration Triphenylmethanfarbstoffe (z. B. Pentamethoxy-Triphenylcarbinol) als Indikatoren, die von farblos (basische Seite) auf rot-violett (sauere Seite) umschlagen. Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 174, S. 277. 1928.

<sup>2)</sup> Vgl. z. B. Ege: Biochem. Zeitschr. Bd. 145, S. 66. 1924.



Reaktion positiv<sup>1)</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 arbeitet), geschüttelt und in ein Wasserbad von 40° 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 cm<sup>3</sup> Gummiarabikumlösung zugefügt und nach Ege titriert (vgl. S. 260).

b) Gesamtpepsin. 1 cm<sup>3</sup> des gut durchgeschüttelten Magen-saftes nach der Probemahlzeit wird abgemessen, unter gründlichem Schütteln ein paar Minuten mit 19 cm<sup>3</sup> Phosphatlösung (s. u.) 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 cm<sup>3</sup> Edestinlösung wird 1 cm<sup>3</sup> Filtrat gegeben. Die Zeit vom Zusatz der Phosphatlösung bis zum Zusatz des Filtrats zu der sauren Edestinlösung darf 5—10 Min. nicht 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. 260.

### Harn.

Zum quantitativen Pepsinnachweis im Harn kann man u. a. die Edestinprobe nach Fuld (S. 259) bzw. Ege (S. 260) anwenden, oder man bestimmt nach Hedin<sup>2)</sup> den Stickstoff einer mit der fermenthaltigen Harnlösung versetzten und danach mit Gerbsäure gefällten Kaseinlösung.

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 cm<sup>3</sup> der Lösung genommen.

<sup>1)</sup> Reaktion nach Günzburg: Einige Tropfen des Günzburg-Reagens (2 Tl. Phlorogluzin, 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.

<sup>2)</sup> Hedin: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 112, S. 252. 1921.

2. Kaseinlösung. 20 g Kasein nach Hammarsten werden in 100 cm<sup>3</sup> 0,1 n-NaOH und 400 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O unter Erhitzen auf dem Wasserbade gelöst. Das Volumen wird nach dem Erkalten auf 500 cm<sup>3</sup> aufgefüllt und mit Toluol versetzt.

3. Gerbsäurelösung. 100 g Gerbsäure werden in Wasser gelöst, dazu 50 g Kochsalz und 50 g Natriumazetat, 50 cm<sup>3</sup> Eisessig zugefügt und mit Wasser auf 1000 cm<sup>3</sup> aufgefüllt.

4. 0,1 n-Salzsäure.

Ausführung: 25 cm<sup>3</sup> der Harnlösung werden mit 25 cm<sup>3</sup> Kaseinlösung + 15 cm<sup>3</sup> 0,2 n-HCl versetzt ( $p_n$  ca. 1,6). In Gegenwart von Toluol wird 4 Tage lang bei 37° digeriert und dann 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 erhitzte Harnlösungen.

### Lab, Chymosin.

Als Lab wird das Ferment bezeichnet, das Milch oder kalziumhaltige Kaseinlösungen 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 wirk-

<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: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 79, S. 425. 1900.

<sup>3)</sup> Wohlgemuth: Grundriß der Fermentmethoden S. 162. Berlin 1913.

samer Lablösungen benutzen. Man extrahiert mit Glycerin oder verdünnter Salzsäure und neutralisiert dann.

Darstellung pepsinfreier Chymosinlösung nach Hammarsten<sup>1)</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 über 0° liegenden Temperatur unter häufigem Umschütteln digeriert. Danach wird filtriert, 100 cm<sup>3</sup> des Auszuges mit etwa 1 g Magnesiumkarbonat versetzt<sup>2)</sup> und einige Minuten geschüttelt. Dann wird rasch filtriert und auf Pepsin und Chymosin geprüft; die Behandlung des Filtrates mit Magnesiumkarbonat 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 Magnesiumkarbonat 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 Kaseinlösung, 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 0,2proz. 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>3)</sup>. Das Kälberchymosin wird hierbei rascher als das Pepsin zerstört, man erhält daher nach einiger Zeit

1) 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.

2) Vgl. Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 56, S. 53. 1908.

3) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 56, S. 61. 1908.

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>1)</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 Exsikkator 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 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- als auch 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 einem Niederschlag 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 Exsikkator 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 Exsikkator 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—4 mal 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.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 94, S. 104. 1915.

Nach dem Auslaugen und Auswaschen mit Wasser kann man den ungelösten Rückstand bei Zimmertemperatur mit 0,1 proz. 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 Aufschlänmen in Wasser behandeln. Der obige Gang führt aber zu reineren Enzymlösungen<sup>1)</sup>.

Nachweis nach Michaelis und Rothstein<sup>2)</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 Kasein 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>3)</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 CaCl<sub>2</sub>-Lösung (10 g möglichst trockener Kristalle von wasserhaltigem CaCl<sub>2</sub> auf 100 cm<sup>3</sup> Wasser) versetzt.

<sup>1)</sup> Vgl. auch Hammarsten: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 74, S. 142. 1911.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 60. 1920. Vgl. auch Dtsch. med. Wochenschr. 1918, S. 685.

<sup>3)</sup> Vgl. hierzu Hammarsten: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 121, S. 262. 1922.

3. Kontrollösung, siehe S. 263 (die Glycerinstammlösung 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 Kontrollösung 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 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;  $1,0\text{ cm}^3$  und füllt die Röhrchen mit destilliertem Wasser alle auf  $2\text{ cm}^3$  auf. Ein fünftes Röhrchen wird mit  $2\text{ cm}^3$  der Kontrollfermentlösung gefüllt. Nunmehr werden in jedes Röhrchen  $2\text{ cm}^3$  Milch rasch (für alle Röhrchen innerhalb 20—25 Sek.) einpipettiert, und zwar in der Reihenfolge Röhrchen I, II, Kontrolle, III, IV. Da die Kontrolle als mittelstes Röhrchen eingefüllt wird, ist der zeitliche Unterschied jedes Röhrchens 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 Röhrchens der Reihe zusammen, so ist der Fermentgehalt der zu untersuchenden Lösung gleich dem Verdünnungsgrad dieses Röhrchens; 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.

<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.

Rona und Gabbe<sup>1)</sup> benutzten für ihre Untersuchungen nicht Milch, sondern Trockenmilchpulver (Krause, München)<sup>2)</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 aufgekocht, nach dem Abkühlen filtriert. Als Regulator der [H<sup>+</sup>] dienten Azetatgemische: eine 1 n-Lösung von Natriumazetat wurde mit  $\frac{1}{10}$  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  $\frac{1}{5}$  des Endvolumens (10 cm<sup>3</sup>) zugefügt. Die Konzentration in allen Versuchen an Natriumazetat 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 Röhren 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 Kaseins in Parakasein 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>3)</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 spon.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 39. 1922.

<sup>2)</sup> Fuld hat bereits bei seinen Untersuchungen künstliche Milch verwendet.

<sup>3)</sup> Vgl. hierzu S. 253.

tane 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>1)</sup>. Durch Kalzium und durch andere Erdalkalisalze allein ist eine Aktivierung nicht zu bewerkstelligen.

#### Darstellung.

Darstellung nach Michaelis<sup>2)</sup>. Ein relativ reines Trypsinpräparat gewinnt man, wenn man irgendein käufliches Trypsinpräparat, z. B. Trypsinum puriss. Rhenania, mittels milchsauren Natriums 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  $\alpha$ -Nukleoproteids und die isoelektrische Reaktion des Trypsins liegen praktisch bei derselben Wasserstoffionenkonzentration, und das ausgefällte  $\alpha$ -Nukleoprotein adsorbiert fast das gesamte Trypsin der Lösung.

Darstellung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz<sup>3)</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

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 181. 1923; Bd. 142, S. 217. 1925. Vgl. auch Waldschmidt-Leitz u. 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 Erespins 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 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, Erespin und Enterokinase, die sich in der Schleimhaut angehäuft finden, könnten sie wiederum als Sekretionsprodukt verlassen, wengleich sie ihre eigentliche Entstehung der Pankreasdrüse verdankten.“

<sup>2)</sup> Michaelis und Davidsohn: Biochem. Zeitschr. Bd. 144, S. 294. 1924. Vgl. auch Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 481, 1910.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 125, S. 132 (u. 150). 1923; Bd. 126, S. 143. 1922; Bd. 142, S. 217. 1924.



Azeton verrieben, bis man ungefähr die 5—6 fache Menge Azeton zur Drüsensubstanz gesetzt hat. Die Aufschwemmung wird portionsweise in Flaschen gut durchgeschüttelt. Nach 1—2stündigem Stehen wird filtriert, der Filtrierrückstand von neuem durch Schütteln in den Flaschen und Filtrieren wie zuvor mit derselben Menge Azeton, darauf mit der halben Menge Azeton 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 Siebrückstand muß das Mahlen und Sieben öfters wiederholt werden. Der feine Anteil enthält die Hauptmenge der Drüsensubstanz. Der grobfaserige Anteil enthält auch noch beträchtliche Mengen an Drüsensubstanz, deren Ablösung mit mechanischen Mitteln aber nicht mehr gelingt. Die Ausbeute an entfetteten trockenen Drüsen beträgt fast  $\frac{1}{5}$  der gereinigten frischen und die Ausbeute an feinem Drüsenpulver  $\frac{2}{3}$  des ganzen Trockenpankreas. So lieferten z. B. 750 g Schweinepankreas nach dem Herauspräparieren des Fettes und Durchdrücken 110 g Brei. Daraus wurden 21,5 g Pulver erhalten, und zwar 19,5 g gesiebtes Pulver und 2 g Faserrückstände. Aus 500 g Leberbrei wurden z. B. 105 g gesiebtes Pulver und 6 g Faserrückstände gewonnen.

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 etwa 16fachen Menge 87proz. Glycerins 4—8 Std. lang bei  $30^{\circ}$ . 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 Drüsensubstanz durch Zentrifugieren bei hoher Tourenzahl (eine halbe Stunde bei 6000 Touren). (Am einfachsten ist es, die Glycerinaufschwemmung durch ein großes, trockenes Filter über Nacht in ein trockenes Gefäß filtrieren zu lassen. Das Filtrat ist dann immer absolut klar.) Der Rückstand wird noch wiederholt mit Glycerin ausgezogen. Der noch stark getrübbte 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 Glycerinlösungen findet man nur etwa die halbe tryptische Wirkung wie in der getrockneten Pankreasdrüse.

Aus den Glycerinauszügen läßt sich die Lipase durch Aluminiumhydroxyd und durch Kaolin leicht adsorbieren (vgl. S. 112). 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. 5).

Bei der ersten Adsorption sind in der sauer reagierenden Restlösung mit einem kleinen Teil der Lipase diastatisches und proteolytisches Enzym zurückgeblieben. Es bedarf nur einer Wiederholung 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 elektroosmotisch oder mit HCl gereinigten Kaolins. 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. 7).

<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.

Über Eigenschaften und Darstellung von fermentativ einheitlichem Trypsin geben Willstätter und Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup> weitere Angaben, die hier zum Teil wiedergegeben werden sollen. Im aktivierten Zustand ist das Ferment unbeständig, da in den wässerigen Lösungen, wo alsbald die spontane Bildung von Enterokinase beginnt, das Ferment rasch zerstört wird. Bei hinlänglichem Gehalte der Fermentlösung an Glyzerin, das der Selbstaktivierung entgegenwirkt, erfolgt unter sonst gleichen Bedingungen keine Verminderung der fermentativen Wirkung. Der Fermentgehalt der Glyzerinauszüge der Drüse ist auch nach Monaten unverändert. — Was die Adsorptionsverhältnisse gegenüber Tonerde anlangt, so hat es sich gezeigt, daß das Trypsin aus den Glyzerinauszügen der Pankreasdrüse von Tonerde der Sorte  $\gamma$  (vgl. S. 6) bei hinreichender Azidität, z. B.  $p_h$  4,7 gar nicht oder nur sehr wenig aufgenommen wird; für die Abtrennung des Trypsins von Lipase und Erepsin ist also diese Tonerde-Sorte am geeignetsten. (Es ist zu beachten, daß Hefetrypsin von derselben Tonerde  $\gamma$  im sauren Gebiete viel leichter adsorbiert wird.) Durch mehrmalige, oft schon durch zweimalige Adsorption der pankreatischen Auszüge an die Tonerde  $\gamma$  erreicht man, daß der Lipasegehalt der Adsorptionsrestlösung ganz gering ist, während die überwiegende, in der Regel die ganze Menge des Trypsins und auch der größte Teil der Amylase der Adsorption entgeht. Nun wird das Trypsin aus den Mutterlaugen der Tonerdeadsorption, wenn es vom lipatischen und ereptischen Ferment befreit ist, bei neutraler oder saurer Reaktion leicht vom Kaolin aufgenommen, während der größte Teil der Amylase zurückbleibt. So gelingt die Abtrennung von der Amylase.

Beispiel für die Reinigung des Trypsins nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz, Dunaiturria und Künstler i. c. S. 205.

7,5 cm<sup>3</sup> Glyzerinauszug aus Pankreas, die mit 7,5 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{15}$ n-Azetatpuffer von  $p_h = 4,7$  verdünnt waren, enthielten 61,8 T.-(e) [0,10 cm<sup>3</sup>: 0,50 cm<sup>3</sup> 0,2 n-KOH: 0,41 T.-(e)], 37,5 L.-E. (0,20 cm<sup>3</sup>: 15,4% Spaltung [Olivenöl]: 0,50 L.-E.) und 43,5 Am.-E. (0,001 cm<sup>3</sup>, 10 Minuten: 12,0 mg Maltose;  $k = 0,0029$ ). Zu der eiskühlten Lösung fügte man 10,5 cm<sup>3</sup> Tonerdesuspension  $C\gamma = 88,2$  mg  $Al_2O_3$ , dann zu der in der Zentrifuge abgeschleuderten Mutterlauge weitere 16 cm<sup>3</sup> des Gels (= 134,4 mg  $Al_2O_3$ ); nun wurde die Restlösung von der Adsorption mit n-NH<sub>3</sub> gegen Lackmus neutralisiert. Sie enthielt in 30 cm<sup>3</sup> noch 60 T.-(e) [0,10 cm<sup>3</sup>: 0,30 cm<sup>3</sup> 0,2 n-KOH: 0,20 T.-(e)] neben 0,2 L.-E. (3,0 cm<sup>3</sup>: 1,1% Spaltung [Olivenöl]; 0,02 L.-E.) und 17,4 Am.-E. (0,005 cm<sup>3</sup>, 10 Minuten:

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 161, S. 199. 1926,

12,3 mg Maltose;  $k = 0,0029$ ) oder 97<sup>0</sup>/<sub>100</sub> vom Trypsin, 0,6<sup>0</sup>/<sub>100</sub> von der Lipase und 40<sup>0</sup>/<sub>100</sub> von der Amylase des Extraktes; die Abtrennung der Lipase war also praktisch vollständig.

18,0 cm<sup>3</sup> lipasefreie Restlösung der Tonerdeadsorption (mit 36 T.-(e) und 10,4 Am.-E.), die neutralisiert waren ( $p_h = 7,0$ ), behandelte man mit insgesamt 20 cm<sup>3</sup> Kaolinsuspension (= 1,55 g), und zwar 4mal mit je 5,0 cm<sup>3</sup> derselben unter jeweiliger Abtrennung des Adsorbates in der Zentrifuge; die vereinigten Adsorbate wurden mit 30 cm<sup>3</sup> 2<sup>2</sup>/<sub>3</sub> basischem Ammonphosphat (57 Vol. 1 proz. Diammonphosphat, 3 Vol. n-NH<sub>3</sub>, 40 Vol. 87 proz. Glycerin) eluiert und die erhaltene Elution alsbald mit n-Essigsäure neutralisiert.

In 30 cm<sup>3</sup> der Restlösung von der Kaolinadsorption fand man keine tryptische Wirkung mehr, aber noch 1,08 Am.-E. (0,05 cm<sup>3</sup>, 10 Minuten: 7,5 mg Maltose;  $k = 0,0018$ ), während die aus den Adsorbaten bereitete Elution in insgesamt 28 cm<sup>3</sup> 28 T.-(e.) [0,30 cm<sup>3</sup>: 0,45 cm<sup>3</sup> 0,2 n-KOH: 0,30 T.-(e.)], d. i. 77<sup>0</sup>/<sub>100</sub> von der Trypsinmenge der lipasefreien Lösung und 75<sup>0</sup>/<sub>100</sub> von der des Glycerinauszuges enthielt; der Amylasegehalt der Elution war nur geringfügig, er entsprach insgesamt 0,67 Am.-E. (0,05 cm<sup>3</sup>, 10 Minuten: 5,1 mg Maltose;  $k = 0,0012$ ).

Darstellung des Hefetrypsins<sup>1)</sup>. Die Darstellung von dipeptidasefreiem Hefetrypsin gelingt auf Grund der geringen Beständigkeit, durch die die dipeptidspaltende Komponente bei der Aufbewahrung in wässriger Lösung, wie auch gegenüber der Einwirkung von Säuren und Alkalien ausgezeichnet ist. In schwach-saurer Lösung wird umgekehrt wie im Falle der Pankreas- und der Darmprotease, das tryptische Ferment verhältnismäßig leicht, das ereptische erheblich schwerer von Aluminiumhydroxyd aufgenommen und bei wiederholter Adsorption gelingt es, einen Teil des dipeptidspaltenden Fermentes frei von tryptischer Wirkung zurückzubehalten, während das Hefetrypsin aus den Adsorbaten durch Ammoniak unwirksam gegenüber Dipeptiden erhalten werden kann. Die günstigsten Bedingungen für die Trennung sind Verwendung ganz frischer Autolysate und Adsorption aus möglichst saurer und verdünnter Lösung.

Beispiel für die Darstellung der einheitlichen Dipeptidase<sup>1)</sup>. 500 g frische abgepreßte Bierhefe wurden mit 50 cm<sup>3</sup> Essigester unter Umrühren rasch verflüssigt, mit Wasser zu einem Volumen von 1 Liter verdünnt und die auftretende Säure

<sup>1)</sup> Nach Graßmann: Neue Methoden und Ergebnisse der Enzymforschung. S. 131. München 1928. Vgl. auch Graßmann: Trennung der Hefeproteasen in Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. IV, Teil 1, S. 799. 1930.

fortlaufend mit Ammoniak unter Vermeidung jeden Alkaliüberschusses ( $p_h = 6,5-7$ ) neutralisiert. Der nach  $1\frac{1}{2}$  Stunden in der Zentrifuge abgetrennte Verflüssigungssaft war gegen Gelatine und Leuzyglyzin wirkungslos.

Der Heferückstand wurde mit etwa 2 l Wasser gewaschen, von neuem in Wasser zu einem Volumen von 1 l unter Zusatz von Toluol suspendiert und die Enzymlösung nach 22 Stunden (vom Versuchsbeginn an) isoliert. Sie enthielt im  $\text{cm}^3$  3,54 Einheiten der Dipeptidase und 0,31 Einheiten des Trypsins.

400  $\text{cm}^3$  des erhaltenen Verflüssigungssaftes brachte man mit Essigsäure auf annähernd  $p_h = 5,0$ , fügte 80  $\text{cm}^3$  n/2-Azetatpuffer von gleicher Reaktion hinzu, versetzte mit einer Suspension von 700 mg Tonerde A und ergänzte das Volumen zu 1600  $\text{cm}^3$ . Das abzentrifugierte, verlustlos gesammelte Tonerdegel wurde im Meßkolben zu einem Volumen von 50  $\text{cm}^3$  suspendiert (1  $\text{cm}^3 = 14 \text{ mg Al}_2\text{O}_3$ ).

70  $\text{cm}^3$  der Enzymlösung (248 Einheiten der Dipeptidase und 21,6 Trypsineinheiten enthaltend) brachte man mit 0,6  $\text{cm}^3$  n/1-Essigsäure auf annähernd  $p_h = 5,0$ , fügte 6,6  $\text{cm}^3$  n/2-Azetatpuffer gleicher Reaktion und etwa 170  $\text{cm}^3$  Wasser hinzu. Nach Zugabe von 6,4  $\text{cm}^3$  der vorbehandelten Tonerdesuspension (90 mg  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) wurde das Volumen zu 250  $\text{cm}^3$  ergänzt. Nachdem das Adsorbat in der Zentrifuge abgetrennt war, wiederholte man die Behandlung mit einer gleichen Menge Tonerde noch viermal, rasch und möglichst in der Kälte. Die letzte Restlösung hatte ein Volumen von 275  $\text{cm}^3$ ; sie war frei von Trypsin und enthielt 105 Einheiten, das sind 42% der angewandten Dipeptidase.

Beispiel für die Darstellung des Hefetrypsins<sup>1)</sup>. 1100  $\text{cm}^3$  einer Enzymlösung (1690 Einheiten der Dipeptidase und 211 Trypsineinheiten enthaltend), die wie im vorhergehenden Beispiel gewonnen war, behandelte man bei  $p_h = 5$  (n/60-Azetatpuffer) in einem Volumen von 2800  $\text{cm}^3$  mit 1 g Tonerde A, die wie oben vorbehandelt worden war. 90% der Dipeptidase und 33% des Trypsins blieben in der Restlösung zurück.

Das Adsorbat eluierte man mit 6 g Diammonphosphat in 260  $\text{cm}^3$ . Die erhaltene Lösung, deren Volumen nach der Neutralisation mit Essigsäure 271  $\text{cm}^3$  betrug, enthielt 38 Dipeptidaseeinheiten, das sind 2,2% der ursprünglichen Menge und 90 Trypsineinheiten, das sind 43% der angewandten und 64% der adsorbierten Menge.

Die Elution wurde durch Zusatz von 38  $\text{cm}^3$  n/1-Essigsäure wieder auf  $p_h = 5,0$  gebracht und erneut in einer Verdünnung von

<sup>1)</sup> Nach Graßmann: Methoden und Ergebnisse. S. 131.

1200 cm<sup>3</sup> mit 0,32 g der vorbehandelten Tonerde versetzt. Gemäß der Analyse der Restlösung waren 50% des Trypsins und etwa 10% der zuletzt vorhandenen Dipeptidase in das Adsorbat übergegangen.

Die Elution erfolgte durch 270 cm<sup>3</sup> n/50-NH<sub>3</sub>. Die erhaltene Lösung (Volumen nach der Neutralisation 275 cm<sup>3</sup>) enthielt 27 Trypsineinheiten (60% der adsorbierten Menge) und war frei von Dipeptidase. Das Hefetrypsin ist in einer solchen Lösung etwa achtmal reiner als im angewandten Autolysat.

Bei Prüfung des Hefetrypsins mißt man die Wirkung des Fermentes auf 0,6 g Gelatine in 10 cm<sup>3</sup> bei 40° und bei  $p_h$  5,0 ( $\frac{1}{31}$  m Dinatriumzitat). Die festgesetzte Einheit entspricht dem Fermentgehalt von 100 mg eines etwas gereinigten Trockenpräparates. — 0,6 Einheiten bewirken unter den Versuchsbedingungen in 24 Stunden einen Aziditätszuwachs entsprechend 1,50 cm<sup>3</sup> 0,2 n-KOH.

Über die Trypsin-Einheit vgl. auch S. 309.

#### Nachweis und Bestimmung.

Zur oberflächlich orientierenden Prüfung kann man eine der älteren Methoden [Auflösung einer mit Kongorot oder Spritblau<sup>1)</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>2)</sup>, von Fuld<sup>3)</sup> und von Michaelis<sup>2)</sup> beschriebene. Die Methode beruht auf dem Prinzip, daß aus einer dünnen Kaseinlösung (0,1% in 1proz. Sodalösung) das unveränderte Kasein durch 1proz. Essigsäure ausgefällt wird. Man bestimmt entweder die Zeit, welche vergeht, bis eine der Trypsinverdauung unterworfenen Kaseinlösung durch Essigsäure nicht mehr getrübt wird, oder man bestimmt die Fermentverdünnung, bei der bei konstanter Zeit die Trübung ausbleibt.

Erforderliche Lösungen. 1. 1prom. Kaseinlösung. 0,1 g Kasein (Hammarsten) wird in einem 200 cm<sup>3</sup> fassenden Becherglas mit 5 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$  n-NaOH und 25 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser versetzt, und auf dem Drahtnetz zum Sieden erhitzt. Nach ein-

<sup>1)</sup> Vgl. Smorodinzew und Adowa: Biochem. Zeitschr. Bd. 153, S. 14. 1924.

<sup>2)</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>3)</sup> Fuld, v. Bergmann u. Meyer: Berlin. klin. Wochenschr. 1908, S. 1673.

maligem Aufkochen wird das Becherglas in einem Gefäß mit kaltem Wasser gekühlt und die überschüssige Lauge mit  $\frac{1}{10}$  n-HCl neutralisiert. (Hierzu sind etwa  $4,5 \text{ cm}^3$  nötig.) Die Lösung wird mit destilliertem Wasser auf  $100 \text{ cm}^3$  aufgefüllt. — Oder man löst  $0,1 \text{ g}$  Kasein in  $100 \text{ cm}^3$   $0,1$  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  $2 \text{ cm}^3$  der 1 prom. Kaseinlösung zugesetzt, sämtliche Gläschen für 1 Std. bei  $38^\circ$  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 Kaseinlösung von  $1,0 \text{ cm}^3$  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. Die Methode kann als erste Orientierung über die Proteasewirkung benutzt werden.

Gelatinelösung:  $1400 \text{ g}$  Gelatine werden in ca.  $2,5 \text{ l}$  lauwarmen Wassers gelöst und die zähe Flüssigkeit durch ein Sieb gegossen; dazu gibt man ca.  $2 \text{ g}$  Thymol und  $25 \text{ cm}^3$  ca.  $5 \text{ n-Natriumhydroxydlösung}$ . Die auf Lackmuspapier noch schwach sauer reagierende Lösung wird auf  $4000 \text{ cm}^3$  aufgefüllt, in  $200\text{-cm}^3$ -Flaschen gefüllt und im Eisschrank aufbewahrt. (100 g der von diesen Autoren benutzten Gelatinelösung mit  $625 \text{ cm}^3$  Wasser verdünnt hatten einen  $p_h = 5,8$ .) Zum Versuch werden kurz vorher  $200 \text{ g}$  dieser 35 proz. Lösung abgewogen und mit Wasser, in dem  $15,5 \text{ g}$  reine Borsäure als Puffer gelöst sind, auf  $1 \text{ l}$  aufgefüllt. In den Versuchen werden  $40 \text{ cm}^3$  dieser Lösung zu  $50 \text{ cm}^3$  verdünnt. Die endgültige Gelatinekonzentration beträgt also gegen  $6\%$ .

Ausführung: Man füllt in  $100 \text{ cm}^3$  Kjeldahlkolben je  $40 \text{ cm}^3$  der borsäurehaltigen Gelatinelösung. Dazu setzt man so viel

<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.

n-NaOH, daß die Kolben eine bestimmte und gleiche  $[H]$  haben, insgesamt  $8 \text{ cm}^3$  Flüssigkeit. Die Kolben werden ca. 20 Min. im Thermostaten von  $30^0$  gewärmt, worauf man  $2 \text{ cm}^3$  der verdünnten (nicht vorgewärmten) Trypsinlösung zusetzt und gut schüttelt. Nach Ablauf bestimmter Zeiten werden den Kolben je  $5 \text{ cm}^3$  entnommen und in Reagensgläser (Durchmesser 21--22 mm) eingefüllt, die in  $1 \text{ cm}^3$  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 Gelatine werden in 3 l einer m/128-Essigsäure von  $10^0$  eingetragen und häufig umgerührt. Nach halbstündigem Stehen wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen und frische m/128-Essigsäure von  $10^0$  bis zum ursprünglichen Volumen zugesetzt. Dann wird wieder

<sup>1)</sup> Northrop: Journ. of gen. physiol. Bd. 4, S. 227. 1922.

<sup>2)</sup> Vgl. Henri u. des Bancel: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 55, S. 563, 787, 788. 1903 und Bayliss: Arch. de biol. Bd. 11, Suppl. 261. 1904.

<sup>3)</sup> Loeb: Die Eiweißkörper. S. 39. Berlin: Julius Springer 1924.



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 5 mal mit je 1 l Wasser von 5° gewaschen. Dann wird die 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 bereite Gelatine (siehe oben) wird gewaschen, durch Wasserzusatz unter Erwärmen (bei etwa 50°) auf einem Wasserbad gelöst, wobei die Gelatinekonzentration auf etwa 5% gebracht wird, und mit NaOH zu einem  $p_h$  von 6,3 titriert. Die Lösung wird bis zu einer Konzentration von 2,5 g Gelatine 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 Thymolkristalle 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 filtrierte Lösung wird so viel 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 Kohlrauschbrücke 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 Ände-

rung in der Leitfähigkeit jeder der verschiedenen Lösungen bedeuten.

**Leitfähigkeitsgefäß.** Die Abb. 90 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. 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 Sieglack 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 Sieglack erwärmt und dann die Elektroden entfernt oder nähert. (Der Widerstand im Gefäß mit einer Flüssigkeit von  $2 \cdot 10^{-3}$  spez. Leitvermögen beträgt

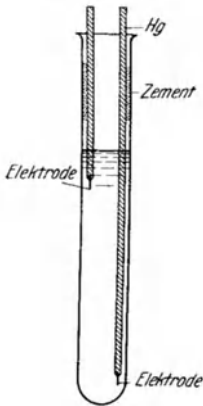


Abb. 90.

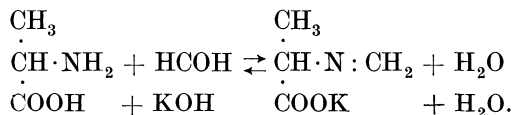
dann  $\frac{3,5}{2 \cdot 10^{-3}} = 1,75 \cdot 10^3$  Ohm, vgl. S. 48.)

**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 (wenn man von der Einstellung 500 mm ausgeht) 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 eine Verschiebung von 10 mm am Meßdraht zu bestimmen, wird durch Interpolation gefunden. Das entspricht einer Änderung der spez. Leitfähigkeit von  $0,0782 \times 10^{-3}$  reziproken Ohm und ist weniger als  $10^0/0$  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 Karboxyl- und Aminogruppen. Sörensen hat durch Formolzusatz die vorhandenen bzw. gebildeten Aminogruppen neutralisiert und dadurch die Karboxylgruppe 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 Indikator ist Phenolphthalein, wenn zur stark roten Farbe titriert wird, oder noch besser Thymolphthalein.

Fehlerquellen. Das Resultat wird fehlerhaft bei Gegenwart von größeren Mengen von  $\alpha$ -Prolin und Tyrosin, was bei den gewöhnlichen Proteinstoffen nicht der Fall ist. Harnstoff und Guanidinsalze (ebenso Arginin) verhalten sich auch nach Formolzusatz wie völlig neutrale Stoffe. Sind größere Mengen

<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.

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. Bei höherem Phosphatgehalt ist kein brauchbarerer Farbenumschlag zu erzielen.

Erforderliche Lösungen. (Bei der Titration mit Phenolphthalein. Für die Titration mit Thymolphthalein vgl. S. 292).

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.) Soll nur der Zuwachs an den Karboxyl-Gruppen ermittelt werden, so können die Lösungen ohne besondere Vorbereitung sofort titriert werden. Will man jedoch den absoluten Gehalt an „Formolstickstoff“ kennenlernen, so sind die Lösungen vorher zu neutralisieren und von Phosphorsäure zu befreien. Um die Phosphorsäure und die Kohlensäure zu entfernen, werden 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 gesättig-

<sup>1)</sup> Vgl. hierzu Sörensen: Biochem. Zeitschr. Bd. 25, S. 1. 1901.

ten Lösung von Bariumhydroxyd zunächst bis zur roten Farbe, und dann noch weitere  $5 \text{ cm}^3$  zugegeben. Nach Auffüllen mit Wasser bis zur Marke, gutem Umschütteln und viertelstündigem Stehen wird durch ein trockenes Filter filtriert.  $80 \text{ cm}^3$  des Filtrates (A) werden in einem  $100\text{-cm}^3$ -Meßkolben mit  $1/5 \text{ n-HCl}$  gegen Lackmuspapier neutralisiert und darauf mit ausgekochtem Wasser bis auf  $100 \text{ cm}^3$  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. 300, vgl. auch Praktikum II, S. 173, 360), der Destillationsrückstand in einigen  $\text{cm}^3 \text{ n-HCl}$  gelöst, durch den Kolben  $\text{CO}_2$ -freie Luft durchgesogen (um eine eventuelle Spur von Kohlensäure auszutreiben), und dann die salzsaure Lösung in einem  $100\text{-cm}^3$ -Meßkolben gegen Lackmuspapier neutralisiert, schließlich mit  $\text{CO}_2$ -freiem Wasser bis zur Marke nachgefüllt und in einer passenden Menge (z. B.  $40 \text{ cm}^3$  entsprechend  $16 \text{ cm}^3$  der ursprünglichen Flüssigkeit) die Formoltitration ausgeführt.

Entfärbung. Ist die Entfärbung notwendig und liegt eine passend saure Flüssigkeit vor (d. h. in bezug auf den Säuregehalt ungefähr  $1/10 \text{ n}$ ), so werden  $25 \text{ cm}^3$  derselben in einen  $50\text{-cm}^3$ -Meßkolben gebracht. Ist die vorliegende Lösung nicht passend sauer, nimmt man nur  $20 \text{ cm}^3$ , und es werden je nach den Umständen z. B.  $5 \text{ cm}^3 \text{ n}/2$ -Salzsäure bzw. Natronlauge zugesetzt. Danach werden ca.  $4 \text{ cm}^3 \text{ 2 n-Bariumchloridlösung}$  ( $244 \text{ g BaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  in  $1 \text{ l}$  Lösung) zugesetzt und nach und nach unter gutem und häufigem Schütteln (die letzten Male muß der Kolben während des Schüttelns geschlossen sein)  $20 \text{ cm}^3$  ca.  $1/3 \text{ n-Silbernitratlösung}$  ( $56,7 \text{ g}$  reines  $\text{AgNO}_3$  in  $1 \text{ l}$ ), am besten aus einem kleinen Meßzylinder zugetropft. Wenn der gebildete Schaum nach kurzem Stehen sich gesetzt hat, wird kohlenstoffreies Wasser bis zur Marke zugesetzt und überdies dem gebildeten Silberchlorid entsprechend noch 4 Tropfen Wasser. Nach gutem Umschütteln wird durch ein gewöhnliches  $11\text{-cm}$ -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 ( $15\text{—}30 \text{ cm}^3$ ) des völlig klaren Filtrats wird dann nach vorherigem Neutralisieren gegen Lackmuspapier die Formoltitration ausgeführt.

Die Titration: Man führt die Titration in  $20 \text{ cm}^3$  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 cm<sup>3</sup> der Formolmischung zu 20 cm<sup>3</sup> der Analyse zugesetzt werden und gleich darauf n/5-Lauge, bis die Färbung stärker als die der Kontrollösung erscheint; dann wieder n/5-Salzsäure, bis die Färbung schwächer als die der Kontrollösung geworden ist, und schließlich wird Lauge zugetropft, bis die Farbstärke der Kontrollösung ganz erreicht ist.

Wenn alle vorliegenden Lösungen auf diese Weise titriert worden sind (Phenolphthalein, zweites Stadium), werden der Kontrollösung 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 Kontrollösung erreicht worden ist. Selbstverständlich kann man auch sofort bis zum dritten Stadium titrieren.

Titration mit Thymolphthalein. Wendet man statt des Phenolphthaleins Thymolphthalein als Indikator 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 cm<sup>3</sup> Handelsformol werden 25 cm<sup>3</sup> absoluter Alkohol, 5 cm<sup>3</sup> Thymolphthaleinlösung und schließlich n/5-Lauge bis zum schwach grünlichen oder bläulichen Farbton zugefügt.

Als Kontrollösung werden auch hier 20 cm<sup>3</sup> ausgekochtes Wasser verwendet. Es werden zuerst 15 cm<sup>3</sup> 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 Zurücktitation mit Salzsäure, wobei die Farbe schwächer werden soll als in der Kontrollösung, wird schließlich Lauge zugetropf, bis der Farbenton der Kontrollösung genau erreicht ist.

Ist die zu titrierende Lösung nur leicht gefärbt, dann kann man, wie früher bemerkt, die Titration dadurch verschärfen, daß man den  $20\text{ cm}^3$  Wasser der Kontrolle vor der Zugabe der Formolmischung einen ähnlichen Farbton erteilt, was sich mit den oben-erwähnten Farblösungen erreichen läßt; oder man bedient sich des von G. S. Walpole<sup>1)</sup> angegebenen kleinen Apparates. Derselbe besteht aus 2 Paar zylindrischen Gläsern mit ebenem Boden, die in einem Gestell, wie es Abb. 91 zeigt, übereinander angebracht sind. In *C* wird dann die auf die Endfarbe der Titrierung eingestellte Kontrollösung, in *D* Wasser und in *A* und *B* gleiche Mengen  $20\text{ cm}^3$  der zu titrierenden Lösung gebracht, wonach man *B* mit der Formolmischung versetzt und die Titration in der Weise vornimmt, daß man zu *B* so lange Lauge usw. zugibt, bis man beim Durchsehen von oben gegen eine weiße belichtete Fläche unten dieselbe Farbennuance in *A* und *B* beobachtet.

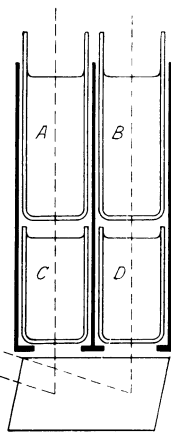


Abb. 91.

Beispiel<sup>2)</sup>:  $125\text{ cm}^3$  einer 4 proz. Wittepeptonlösung und  $75\text{ cm}^3$  einer 0,2 proz. Pankreatinlösung wurden mit Wasser auf  $250\text{ cm}^3$  ergänzt.  $20\text{ cm}^3$  der Flüssigkeit enthielten  $52,00\text{ mg}$  Gesamtstickstoff.

Kontrollösung:  $20\text{ cm}^3$  ausgekochtes Wasser +  $10\text{ cm}^3$  neutralisierter Formollösung + 2 Tropfen Bismarckbraun.

Bei der sofort nach der Zubereitung vorgenommenen Titrierung wurden verbraucht:

Kontrolle	$1,50\text{ cm}^3$ $\frac{1}{5}$ n-NaOH	Versuch ( $20\text{ cm}^3$ )	$3,50\text{ cm}^3$ $\frac{1}{5}$ n-NaOH
	$1,40$ „ $\frac{1}{5}$ n-HCl		$0,45$ „ $\frac{1}{5}$ n-HCl
	$0,10\text{ cm}^3$ $\frac{1}{5}$ n-NaOH		$3,05\text{ cm}^3$ $\frac{1}{5}$ n-NaOH
		Kontrolle	$0,10$ „ $\frac{1}{5}$ n-NaOH
		Verbrauch	$2,95\text{ cm}^3$ $\frac{1}{5}$ n-NaOH

<sup>1)</sup> Walpole: Biochem. journ. Bd. 5, S. 212. 1910.

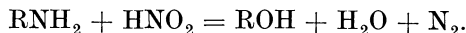
<sup>2)</sup> Jessen-Hansen: l. c. S. 258. Vgl. ferner Henriques und Gjaldbæk: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 75, S. 363. 1911; Henriques und Sørensen: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 64, S. 120. 1909/1910.

1 cm<sup>3</sup> n/5-Natronlauge entspricht 2,8 mg Stickstoff, die 2,95 cm<sup>3</sup> demnach 8,26 mg, d. h. 15,9% des Totalstickstoffs, die als formoltitrierbarer Stickstoff vorhanden sind.

Nach 30 Std. wurden in derselben Weise verbraucht: 5,85 cm<sup>3</sup> 1/5 n-NaOH 16,38 mg N oder 31,5% des Totalstickstoffes.

#### 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 eine

<sup>1)</sup> Darstellung nach van Slyke: 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.



Mineralsäure, aber nicht über  $\frac{1}{2}$  n-Konzentration verwandt werden oder Essigsäure bis 50% oder fixes Alkali bis 1 n-Konzentration.

5. Eisessig.

6. 20 proz. Salzsäure.

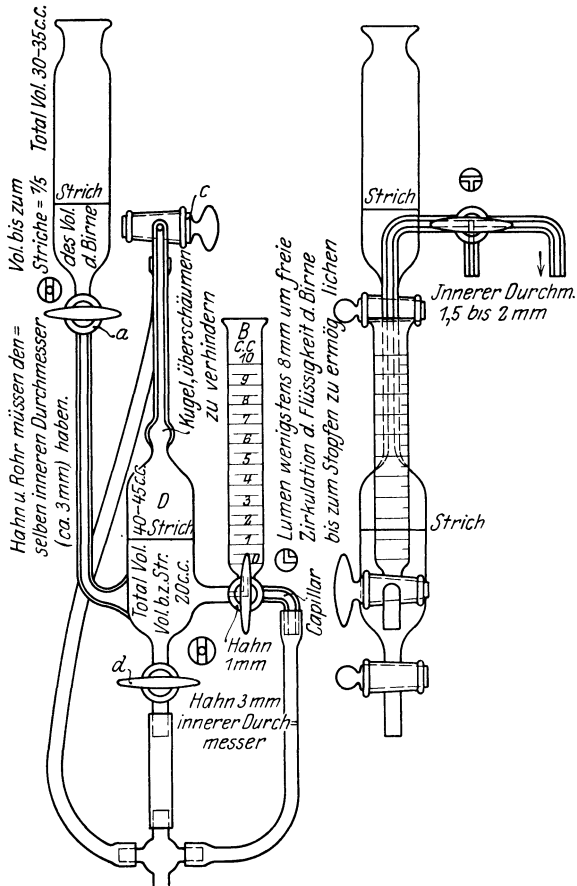


Abb. 92.

Apparat. Die Zusammensetzung des Apparates ist aus Abb. 92 und 93 ersichtlich.

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 Kapillarrohr herum wie ein festes Zentrum wirkt.

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 vorteilhaft mit einer Paste ein, die aus 1 Teil Gummi, 1 Teil Paraffin, 2 Teilen Vaseline durch Erhitzen hergestellt wird. Mit einer Triebwelle kann man abwechselnd sowohl das Desaminierungsgefäß *D* als auch die Hempelsche Bürette schütteln. Die Klammer am Ende der Triebstange und der Haken, an dem die Hempelsche Bürette aufgehängt wird, werden zweckmäßig mit kleinen Stücken Gummischlauch überzogen. Als Triebkraft dient am besten ein kleiner Elektromotor, der mit einem Widerstand für 3—4 Geschwindigkeiten versehen ist. Die Triebwelle soll 300 bis 500 Umdrehungen in der Minute machen. Es kann auch ein Wassermotor benutzt werden.

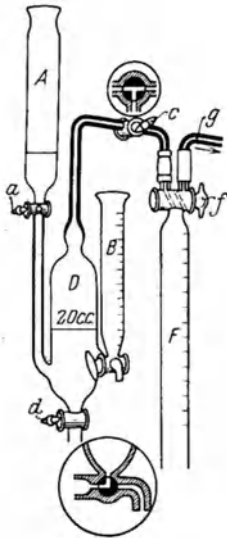


Abb. 93.

Ausführung. 1. Vertreibung der Luft durch Stickoxyd. Wasser von *F* (vgl. Abb. 296) füllt sowohl die Kapillare *g* als auch die andere Kapillare bis *c*. — *A* enthält soviel Eisessig, daß ein Fünftel des Volumens von *D* gefüllt werden kann. Zur Bequemlichkeit ist dieses Volumen in *A* mit einer Marke angezeigt. Den Eisessig läßt man in *D* einfließen, während der Hahn *c* offen ist, damit die Luft aus *D* entweichen kann. Dann füllt man in *A* die Natriumnitritlösung ein, und zwar läßt man soviel einfließen, daß das Gefäß *D* vollständig und schließlich noch ein kleines Volumen über Hahn *a* gefüllt wird. Das aus *D* vertriebene Gas wird dabei bei *c* eingeschlossen. *D* wird nun, während *a* geöffnet, *c* geschlossen ist, einige Sekunden lang geschüttelt. Das Stickoxyd, das sich dabei augenblicklich ansammelt, läßt man dann bei *c* austreten. Hierauf wird das Schütteln wiederholt. Die dabei neuentstandene Menge Stickoxyd, die ebenfalls durch *c* entweicht, beseitigt die letzten Spuren von Luft. Nun bringt man *D* mit dem Motor in Verbindung und läßt so lange schütteln, bis nur noch 20 cm<sup>3</sup> Lösung in *D* zurückbleiben. Dieses Volumen ist durch eine an *D* angebrachte Marke angezeigt. Hierauf schließt

man den Hahn *a* und stellt *c* und *f* so, daß die Verbindung zwischen *D* und *F* hergestellt wird.

2. Zersetzung des Verdauungsgemisches. Von der zu analysierenden Mischung mißt man je nach den vorliegenden Bedingungen 10 cm<sup>3</sup> oder weniger in dem graduierten zylindrischen Gefäß *B* genau ab. Die gewünschte Menge Lösung läßt man dann in das Gefäß *D* einfließen, das mit dem Motor in Verbindung 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 Oktylalkohol (Kahlbaum-Oktylalkohol [sekundär] I) hinzu, nachdem man daraus die Flüssigkeit hat auslaufen lassen<sup>1</sup>).

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, das 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 cm<sup>3</sup>.

Nachdem nun nach Beendigung der Reaktion das Gas voll-

<sup>1</sup>) Dr. K. Zirm hat in meinem Laboratorium für stark schäumende Untersuchungsflüssigkeiten eine Modifikation vorgeschlagen. Sie besteht in einem eingeschmolzenen Platinnetz im obersten Teil des Reaktionsgefäßes und einem seitlich angebrachten Zuflußrohre mit Hahn für evt. notwendigen Oktylalkohol. Sie erlaubt eiweißreiche Flüssigkeiten, z. B. unverdünntes Blutserum, zu untersuchen. — Noch nicht veröffentlicht.

## Tabelle zur Berechnung der Stickstoff-

Dichte des trockenen  
Gewicht von 1 cem Stickstoff in Milligrammen unter dem Druck von 700  
unter Normalbedingungen 1,2507 mg

$p$	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°
700	1,111	1,107	1,103	1,100	1,096	1,092	1,088	1,084
702	1,114	1,110	1,107	1,103	1,099	1,095	1,091	1,087
704	1,118	1,114	1,110	1,106	1,102	1,098	1,094	1,091
706	1,121	1,117	1,113	1,109	1,105	1,101	1,097	1,094
708	1,124	1,120	1,116	1,112	1,108	1,104	1,101	1,097
710	1,127	1,123	1,119	1,115	1,111	1,107	1,104	1,100
712	1,130	1,126	1,122	1,118	1,114	1,111	1,107	1,103
714	1,133	1,129	1,125	1,121	1,118	1,114	1,110	1,106
716	1,137	1,133	1,129	1,125	1,121	1,117	1,113	1,109
718	1,140	1,136	1,132	1,128	1,124	1,120	1,116	1,112
720	1,143	1,139	1,135	1,131	1,127	1,123	1,119	1,115
722	1,146	1,142	1,138	1,134	1,130	1,126	1,122	1,118
724	1,149	1,145	1,141	1,137	1,133	1,129	1,125	1,121
726	1,152	1,148	1,144	1,140	1,136	1,132	1,128	1,125
728	1,156	1,152	1,148	1,143	1,139	1,136	1,132	1,128
730	1,159	1,155	1,151	1,147	1,143	1,139	1,135	1,131
732	1,162	1,158	1,154	1,150	1,146	1,142	1,138	1,134
734	1,165	1,161	1,157	1,153	1,149	1,145	1,141	1,137
736	1,168	1,164	1,160	1,156	1,152	1,148	1,144	1,140
738	1,172	1,167	1,163	1,159	1,155	1,151	1,147	1,143
740	1,175	1,171	1,166	1,162	1,158	1,154	1,150	1,146
742	1,178	1,174	1,170	1,165	1,161	1,157	1,153	1,149
744	1,181	1,177	1,173	1,169	1,165	1,160	1,156	1,152
746	1,184	1,180	1,176	1,172	1,168	1,164	1,160	1,156
748	1,187	1,183	1,179	1,175	1,171	1,167	1,163	1,159
750	1,191	1,186	1,182	1,178	1,174	1,170	1,166	1,162
752	1,194	1,190	1,186	1,181	1,177	1,173	1,169	1,165
754	1,197	1,193	1,189	1,185	1,180	1,176	1,172	1,168
756	1,200	1,196	1,192	1,188	1,183	1,179	1,175	1,171
758	1,203	1,199	1,195	1,191	1,186	1,182	1,178	1,174
760	1,206	1,202	1,198	1,194	1,190	1,185	1,181	1,177
762	1,210	1,205	1,201	1,197	1,193	1,189	1,184	1,180
764	1,213	1,209	1,204	1,200	1,196	1,192	1,188	1,183
766	1,216	1,212	1,207	1,203	1,199	1,195	1,191	1,187
768	1,219	1,215	1,211	1,206	1,202	1,198	1,194	1,190
770	1,222	1,218	1,214	1,209	1,205	1,201	1,197	1,193
$p$	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°

ständig 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 Filtrierpapier oder mit Alkohol und Äther getrocknet. Der Apparat ist nun für eine neue Bestimmung vorbereitet.

**Bestimmungen nach Dumas.**

(argonfreien) Stickstoffs.

bis 770 mm bei 10 bis 25°. Berechnet unter der Annahme, daß 1 cm wiegt (Bestimmung von Lord Rayleigh).

18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°	25°	<i>p</i>
1,081	1,077	1,073	1,070	1,066	1,062	1,059	1,055	700
1,084	1,080	1,076	1,073	1,069	1,065	1,062	1,058	702
1,087	1,083	1,079	1,076	1,072	1,068	1,065	1,061	704
1,090	1,086	1,082	1,079	1,075	1,071	1,068	1,064	706
1,093	1,089	1,085	1,082	1,078	1,074	1,071	1,067	708
1,096	1,092	1,089	1,085	1,081	1,077	1,074	1,070	710
1,099	1,095	1,092	1,088	1,084	1,081	1,077	1,073	712
1,102	1,098	1,095	1,091	1,087	1,084	1,080	1,076	714
1,105	1,101	1,098	1,094	1,090	1,087	1,083	1,079	716
1,108	1,105	1,101	1,097	1,093	1,090	1,086	1,082	718
1,111	1,108	1,104	1,100	1,096	1,093	1,089	1,085	720
1,115	1,111	1,107	1,103	1,099	1,096	1,092	1,088	722
1,118	1,114	1,110	1,106	1,102	1,099	1,095	1,091	724
1,121	1,117	1,113	1,109	1,105	1,102	1,098	1,094	726
1,124	1,120	1,116	1,112	1,109	1,105	1,101	1,097	728
1,127	1,123	1,119	1,115	1,112	1,108	1,104	1,100	730
1,130	1,126	1,122	1,118	1,115	1,111	1,107	1,103	732
1,133	1,129	1,125	1,121	1,118	1,114	1,110	1,106	734
1,136	1,132	1,128	1,125	1,121	1,117	1,113	1,109	736
1,139	1,135	1,131	1,128	1,124	1,120	1,116	1,112	738
1,142	1,138	1,135	1,131	1,127	1,123	1,119	1,115	740
1,145	1,141	1,138	1,134	1,130	1,126	1,122	1,118	742
1,149	1,145	1,141	1,137	1,133	1,129	1,125	1,121	744
1,152	1,148	1,144	1,140	1,136	1,132	1,128	1,124	746
1,155	1,151	1,147	1,143	1,139	1,135	1,131	1,128	748
1,158	1,154	1,150	1,146	1,142	1,138	1,134	1,131	750
1,161	1,157	1,153	1,149	1,145	1,141	1,137	1,134	752
1,164	1,160	1,156	1,152	1,148	1,144	1,140	1,137	754
1,167	1,163	1,159	1,155	1,151	1,147	1,143	1,140	756
1,170	1,166	1,162	1,158	1,154	1,150	1,146	1,143	758
1,173	1,169	1,165	1,161	1,157	1,153	1,149	1,146	760
1,176	1,172	1,168	1,164	1,160	1,156	1,152	1,149	762
1,179	1,175	1,171	1,167	1,163	1,159	1,156	1,152	764
1,182	1,178	1,174	1,170	1,166	1,162	1,159	1,155	766
1,186	1,181	1,177	1,173	1,169	1,165	1,162	1,158	768
1,189	1,185	1,181	1,176	1,172	1,169	1,165	1,161	770
18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°	25°	<i>p</i>

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 Aminosubstanzlösung 10 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser verwendet. Die Menge Gas, welche man gewöhnlich bei einem blinden Versuch während

5 Min. erhält, beträgt 0,3—0,4 cm<sup>3</sup>. Ammoniak ist in größeren Mengen hinderlich bei der Reaktion; man erhält aber bei Gegenwart 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 werden durch Destillation unter Zusatz von Kalziumhydroxyd unter vermindertem Druck. Nach der Destillation wird der Überschuß des Kalziumhydroxyds mit Essigsäure gelöst. — Die zu analysierenden Lösungen sollen frei von Äthylalkohol und Aceton sein. — Zur Verminderung des Schäumens soll nicht Amylalkohol, sondern Kaprylalkohol (Oktylalkohol, sekundär I, Kahlbaum) verwendet werden<sup>1)</sup>.

Zur Berechnung der Resultate diene vorstehende Tabelle, deren Zahlen, durch 2 dividiert, die Gewichte des Aminostickstoffes in Milligrammen darstellen, wie man sie bei der Einwirkung mit salpetriger Säure und beim Messen über Wasser bei den angegebenen Temperaturen und dem betreffenden Barometerstand in 1 cm<sup>3</sup> erhält<sup>2)</sup>. Für die Umrechnung auf Aminostickstoff ist zu berücksichtigen, daß nur die Hälfte des gemessenen Stickstoffes aus der zersetzten Aminosubstanz stammt (vgl. die Gleichung auf S. 294).

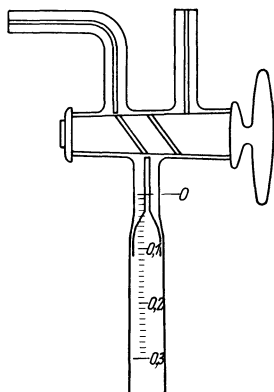


Abb. 94.

Modifikation der Methode mit Benutzung des Mikroapparates. Durch eine geringfügige Änderung der Form der Gasbürette wird die Genauigkeit des Ablesens so erleichtert, daß der Gehalt des ganzen Apparates auf ein

Zehntel des oben beschriebenen Inhalts reduziert werden kann, so daß nur 1 cm<sup>3</sup> der Lösung für die Bestimmung erforderlich ist. Die Form der Bürette ist aus Abb. 94 ersichtlich. Der wesentlichste Unterschied besteht darin, daß der Nullpunkt statt am

<sup>1)</sup> Vgl. Fußnote auf S. 297.

<sup>2)</sup> 1 cm<sup>3</sup> trockener Stickstoff bei 0° und 760 mm entspricht 0,6253 mg Aminostickstoff oder 0,4466 cm<sup>3</sup> 0,1 n-Säure.

Boden des Hahnes in einem Kapillarrost angebracht ist, welcher sich einige Millimeter unter dem Maße befindet. Die Burette besitzt einen Inhalt von  $3 \text{ cm}^3$  und ist in Hundertstel Kubikzentimeter eingeteilt mit ca. 1 mm weiten Teilstrichen, so daß man durch Abschätzung der Zehntel der Einteilung bis  $0,001 \text{ cm}^3$  ablesen kann.

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 treten. 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 reagiert nur mit seiner primären Aminogruppe. — Bei den Polypeptiden wird das Stickstoffgas nur durch Reaktion mit der einen freien  $\text{NH}_2$ -Gruppe entwickelt. Nur die Glyzylpolypeptide geben statt 1 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 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 Hydro-

$$\text{lyse} = \frac{100 A}{A_1}$$

Beispiel<sup>2)</sup>: Verdauung von Edestin durch Trypsin.  $150 \text{ cm}^3$  Wasser, 6 g lufttrockenes Edestin, 0,5 g Soda, 0,6 g Grüblers Trypsin. Temperatur  $37^\circ$ . Von Zeit zu Zeit werden  $5 \text{ cm}^3$  für die Aminostickstoffbestimmung entnommen (s. Tabelle S. 302). 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, ent-

<sup>1)</sup> Vgl. van Slyke: l. c. S. 280.

<sup>2)</sup> Nach van Slyke: l. c. S. 283.

Stunden	cm <sup>3</sup> N-Gas reduziert auf 0° und 760 mm	% von N	Umfang der Hydrolyse in %
0	1,97 <sup>1)</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

nimmt 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.

In neuerer Zeit hat D. D. van Slyke<sup>2)</sup> seinen im Praktikum II, S. 49, beschriebenen Apparat dazu benutzt, den Aminostickstoff nach der obigen Reaktion (S. 294) zu bestimmen, unter Benutzung einer Mikroeinrichtung. Während die Mikroform des oben dargestellten Apparates (vgl. S. 300) die Messung einer Aminostickstoffkonzentration bis  $\pm 0,001$  mg pro Kubikzentimeter in 2 cm<sup>3</sup> der Lösung gestattet, ist eine Bestimmung nach der neuen Anordnung bis  $\pm 0,0001$  mg pro Kubikzentimeter in 5 cm<sup>3</sup> der zu untersuchenden Probe möglich. Man kann demnach in 5 cm<sup>3</sup> des Folin-Wu-Blutfiltrates (vgl. Praktikum II, S. 161) eine Bestimmung des Aminostickstoffes direkt, ohne vorherige Einengung ausführen. Die Methode ist bereits zum Nachweis der Aminogruppen bei der Proteolyse angewendet worden<sup>3)</sup>. Die Bestimmung dauert 12—15 Minuten. Die höchste Menge an Aminostickstoff, die mit der Methode in einer Probe bestimmbar ist, beträgt etwa 0,6 mg (liefert bei 2 cm<sup>3</sup> Volumen Stickstoffgas von etwa 400 mm Druck); die niedrigste Menge ist etwa 0,0004 mg (liefert Stickstoffgas von 1 mm Druck bei 0,5 cm<sup>3</sup> Volumen). Da 5 cm<sup>3</sup> und noch mehr bei der Analyse angewendet werden können, ist der Amino-

<sup>1)</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.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. Chem. Bd. 83, S. 425. 1929.

<sup>3)</sup> Vgl. Krebs: Biochem. Zeitschr. Bd. 238, S. 174. 1931.



stickstoff bei einer Konzentration von 0,01 mg pro Kubikzentimeter mit 1% Fehler bestimmbar.

Erforderliche Reagentien: 1. Natriumnitritlösung: 800 g  $\text{NaNO}_2$  werden unter Erwärmen in 1 l Wasser gelöst. 2. Eisessig. 3. Alkalische Permanganatlösung: 50 g  $\text{KMnO}_4$  werden mit 1 l 10proz.  $\text{NaOH}$  bis zur Sättigung geschüttelt. 4. Kaprylalkohol zur Verhinderung des Schäumens.

Ausführung: 1. Man befreit die „Aminolösung“ + Essigsäure im Apparat von der absorbierten Luft. 2. Man fügt die

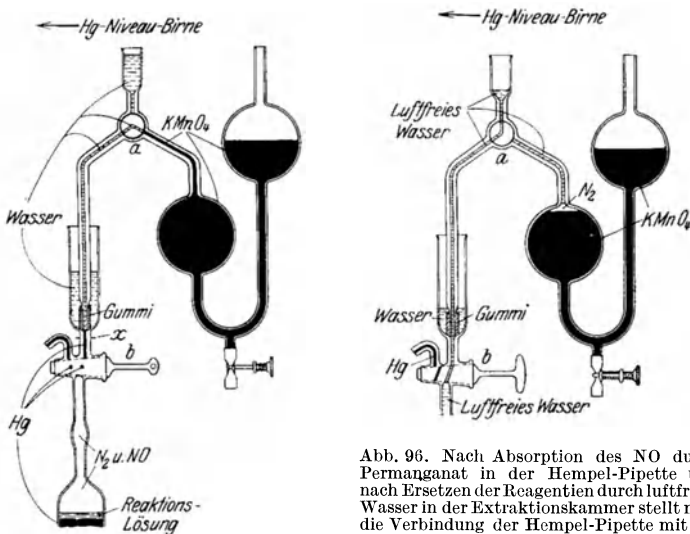


Abb. 95. Apparat in der Stellung zur Überführung des Gemisches  $\text{N}_2 + \text{NO}$  in die Hempel-Pipette durch Drehen des Hahnes *b*.

Abb. 96. Nach Absorption des  $\text{NO}$  durch Permanganat in der Hempel-Pipette und nach Ersetzen der Reagentien durch luftfreies Wasser in der Extraktionskammer stellt man die Verbindung der Hempel-Pipette mit der Kammer wieder her und drückt das Wasser aus der Kammer durch die Kapillare in den Becher der Pipette.

Natriumnitritlösung hinzu und läßt die Reaktion die erforderliche Zeit lang ablaufen. 3. Das Gemisch von  $\text{N}_2$  und  $\text{NO}$  wird in eine Hempel-Pipette überführt, in der das  $\text{NO}$  von Permanganat absorbiert wird. 4. Man entfernt die salpetrige Säure aus der Kammer des van Slyke-Neill-Apparates und bringt das  $\text{N}_2$ -Gas aus der Pipette zurück. 5. Man mißt den Druck des  $\text{N}_2$ -Gases bei einem Volumen von 0,5 oder 2,0  $\text{cm}^3$ .

Die zu untersuchende Probe kann 1—8  $\text{cm}^3$ , am besten 5  $\text{cm}^3$  betragen. Man läßt die Flüssigkeit in die Kammer fließen, dann folgt 1  $\text{cm}^3$  Essigsäure und, wenn nötig, 1 Tropfen Kaprylsäure. Nach Abschluß der Kammer unter Sicherung mit 1 Tropfen

Quecksilber evakuiert man die Kammer (vgl. Praktikum II, S. 50) unter Schütteln (250—300mal in der Minute). Die Flüssigkeit füllt nach Austreibung der Luft die Kapillare bis über den Hahn *b* (Abb. 95). Nun werden 2 cm<sup>3</sup> der Nitritlösung in die Kammer gegeben, worauf die N<sub>2</sub> und NO-Entwicklung sofort beginnt.

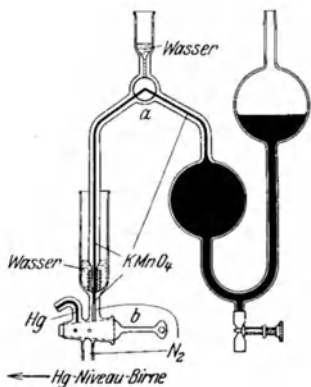


Abb. 97. Das Quecksilberniveau wurde gesenkt und das N<sub>2</sub>-Gas in die Kammer zurückgeführt; die Permanganatlösung folgt bis zum in der Abbildung angegebenen Punkt.

Man evakuiert wie gewöhnlich, bis das Quecksilber zu einem Stand 1—2 cm<sup>3</sup> über der 50-cm<sup>3</sup>-Marke gefallen ist. Man läßt so die erforderliche Zeit (siehe unten) stehen und schüttelt noch zum Schluß, um die Entwicklung des N<sub>2</sub> zu vervollständigen. Ein-

bis zweimal läßt man während des Schüttelns mit Hilfe der Niveau-bürne Quecksilber zufließen, so daß dessen Meniskus sich etwa an der 50-cm<sup>3</sup>-Marke befindet. — Die Zeit bis zur vollständigen Zersetzung der  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe in den Aminosäuren, von dem Augenblick des Zufließens des Nitrits gerechnet, variiert mit der Temperatur, und bei einer gegebenen Temperatur ist sie proportional dem Vo-

Faktoren zur Bestimmung des Aminostickstoffs<sup>1)</sup>.

Temperatur	Faktoren, mit denen mm P <sub>N</sub> multipliziert werden muß, um mg Amino-N in der analysierten Probe zu erhalten	
	a = 0,5 cm <sup>3</sup>	a = 2,00 cm <sup>3</sup>
15	0,000390	0,001561
16	389	55
17	387	49
18	386	44
19	385	38
20	383	33
21	382	27
22	380	22
23	379	16
24	378	11
25	376	06
26	375	00
27	374	0,001495
28	372	90
29	371	85
30	370	80
31	368	74
32	367	69
33	366	64
34	365	59

<sup>1)</sup> Die Werte sind aus der Formel

$$\text{m Mol Gas} = P \times \frac{i \cdot a}{17,024 (1 + 0,00384 t)} \left( 1 + \frac{S}{A - S} \alpha' \right),$$

vgl. Praktikum II, S. 56, berechnet.

lumen, zu dem mit den zugefügten Reagentien verdünnt worden ist. Beträgt das Volumen der Aminosäurenlösung plus dem zugefügten Wasser  $5\text{ cm}^3$ , so daß das Gesamtvolumen in der Kammer  $8\text{ cm}^3$  beträgt, so ist die erforderliche Zeit für die Zersetzung der Aminosäuren 3 Min. bei  $25^{\circ}$ , 4 Min. bei  $20^{\circ}$  und 6 Min. bei  $15^{\circ}$ . Bei geringerem oder größerem Volumen ist die Reaktionszeit entsprechend größer oder kleiner. — Die Übertragung der  $\text{NO} + \text{N}_2$ -Gasmischung in die Permanganatpipette, die Adsorption des  $\text{NO}$ -Gases, der Rücktransport des  $\text{N}_2$ -Gases in die Kammer ist aus den beigefügten Abbildungen ersichtlich.

Bei der Messung des  $\text{N}_2$ -Gases senkt man das Wasserniveau in der Kammer, bis der Wassermeniskus bei der  $0,5\text{-cm}^3$ - oder bei der  $2,0\text{-cm}^3$ -Marke steht (je nach der jeweiligen Gasmenge). Dann liest man am Manometer den Druck  $p_1$  ab. Das Gas wird dann aus der Kammer entfernt, und dann liest man den Manometerstand bei  $p_0$  ab, wobei der Wassermeniskus in der gasfreien Kammer denselben Stand wie bei der Ablesung von  $p_1$  hat. — Eine Kontrollanalyse wird in derselben Weise ausgeführt, nur daß statt der Aminosäurelösung dieselbe Menge Wasser genommen wird. Die Differenz  $p_1 - p_0$  bei dieser Kontrollanalyse ist die Korrektur  $c$  in der unten angegebenen Berechnung.

Berechnung. Der Druck des  $\text{N}_2$ -Gases wird erhalten aus

$$P_{\text{N}_2} = p_1 - p_0 - c$$

und das Gewicht des Amino-N in der Probe:

$$\text{mg Amino-N} = P_{\text{N}_2} \cdot \text{Faktor.}$$

Titrimetrische 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. Die meist verwandten Puffergemische wie Azetat-, Zitrat- und Ammonsalzpuffer stören die Titration nicht; Phosphat in höheren Konzentrationen vermindert die Schärfe des Umschlagspunktes.

Bei der alkalimetrischen Bestimmung von Eiweißabbauprodukten zeigt sich nun ein charakteristischer Unterschied hin-

<sup>1)</sup> Nach Willstätter: Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7. S. 289. — Willstätter u. Waldschmidt-Leitz: Ber. d. dtsh. chem. Ges. Bd. 54, S. 2988. 1921.

sichtlich 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%, zur völligen Ausschaltung der Aminogruppe und Absättigung der Karboxylgruppe mit Alkalihydroxyd. Man muß daher auch das Wasser der n-Lauge berücksichtigen und ersetzt diese zweckmäßig durch eine alkoholische Normallösung<sup>1)</sup>. 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), und in 97proz. (b) alkoholischer Lösung erforderliche Alkalimenge (b kann mit Thymolphthalein auch in 90proz. Alkohol ausgeführt werden). 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% 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 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. Der Alkohol kann durch Petroläther vergällt sein<sup>3)</sup>. Man titriert mit einer 0,2 n-Lösung von Kaliumhydroxyd in 90proz. Alkohol.

<sup>1)</sup> Mit Thymolphthalein als Indikator können Aminosäuren und Peptide in 80 bis 85proz. Methylalkohol vollständig bestimmt werden. Waldschmidt-Leitz und Schöffner: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 151, S. 31. 1925/6.

<sup>2)</sup> Willstätter: l. c. S. 293.

<sup>3)</sup> Um den Alkohol zu regenerieren, destilliert man ihn aus der Titrationmischung ab, kocht zur Entfernung von Ammoniak oder flüchtigen Aminen eine Stunde mit Kaliumbisulfat und entwässert mit Kalziumoxyd.

	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 Azidität 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 Indikatorfarbe infolge einer weiteren Hydrolyse der Proteinsubstanz durch den Laugenüberschuß wieder zu verschwinden.

Zu jeder Bestimmung ist eine Leerbestimmung auszuführen, deren Ansatz analog dem der Hauptbestimmung erfolgt; die der Enzymwirkung entsprechende Aziditätszunahme ergibt sich dann aus der Differenz der beiden Titrationen. Es empfiehlt sich noch, bei Benutzung von Gelatine als Substrat dem Analysen-

<sup>1)</sup> Waldschmidt-Leitz: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 181 (S. 201). 1924.

gemisch vor dem Verdünnen mit Alkohol etwas Chlorkalziumlösung, 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  $\pm 0,04 \text{ cm}^3$  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. 317) 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  $n\text{-NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ -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,  
 $2,0 \text{ cm}^3$   $n\text{-NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ -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. 15 proz. Gelatine.  $37,5 \text{ g}$  zer kleinerte gute Handelsgelatine werden in heißem Wasser gelöst und auf  $250 \text{ cm}^3$  aufgefüllt. Wenn sie aufbewahrt werden soll, wird sie mit Thymol versetzt. Die Lösung bleibt im Thermostaten von  $37^\circ$  flüssig.

2. Trypsinlösung. 1—2 g Pankreaspulver werden mit wenig Wasser zu einem Teig verrieben, darauf langsam, schließlich schneller mit Wasser, insgesamt  $100 \text{ cm}^3$ , angerührt und sofort

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 245. 1925.

filtriert. Das einwandfreieste Material ist der erste Teil des Filtrats, der tryptisch unwirksam ist und in dem beim Stehen sofort die Bildung des Aktivators beginnt. Die Lösung ist nicht haltbar.

3. Enterokinase. 5 g getrocknete Dünndarmschleimhaut (siehe S. 318) 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 eingeeengt.

4. n-NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl-Puffer im Verhältnis 1 : 2.

5. Lösungen zur Titration siehe S. 306.

Als Trypsineinheit wird die tryptische Leistung bezeichnet, die unter den vorgeschriebenen Bedingungen einen Aziditätszuwachs 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> Glyzerinauszug 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 eingeschliffenem 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 2,0 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.

Der von der gesamten Azidität der hydrolysierten Probe abzuziehende Betrag für den Titer der Gelatine, des Enzympräparates und des Puffers ist im Vergleichsversuch zu ermitteln. Das klumpenförmige Ausfallen 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>).

Verbesserte Methode zur Messung der tryptischen Wirksamkeit nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz, Dunaiturria und Künstner<sup>1)</sup>.

Bestimmung von Trypsin mit Gelatine.

Die Fermentprobe von höchstens 10 mg Trockenpankreas oder der äquivalenten Menge einer Lösung wird in einem Fläschchen von 25—40 cm<sup>3</sup> Inhalt mit eingeschliffenem Stopfen mittels 0,30 cm<sup>3</sup> EnterokinaseLösung (vgl. S. 309) auf 5,0 cm<sup>3</sup> mit Wasser aufgefüllt, während 30 Minuten bei 37° aktiviert; zu der aktivierten Mischung gibt man dann 2,00 cm<sup>3</sup> n-NH<sub>3</sub>. NH<sub>4</sub>Cl-Mischung 1:2 und rasch 5,0 cm<sup>3</sup> der im Thermostaten bei 37° aufbewahrten, thymolhaltigen 15proz. Gelatinelösung hinzu und beläßt den Verdauungsansatz während 20 Minuten bei 37°. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Inhalt des Fläschchens in einem Erlenmeyerkolben gegossen, der 5,0 cm<sup>3</sup> absoluten Alkohol und 1,0 cm<sup>3</sup> 1proz. Thymolphthaleinlösung enthält, mit 12 cm<sup>3</sup> Wasser, dann unter Umschütteln des Kolbeninhaltes mit 20 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol wird dann nachgespült. Das klare, 50% Alkohol enthaltende Reaktionsgemisch titriert man nunmehr mit 0,2 n-90proz. alkoholischer Lauge bis deutlich blauer Färbung; dann fügt man rasch und unter Umschütteln 195 cm<sup>3</sup> siedenden absoluten Alkohol zu einem Gehalt von etwa 90% hinzu und vollendet die Titration durch tropfenweise Zugabe der Lauge bis zum Auftreten des ersten graublauen Farbtons; diese zweite Titrationsstufe erfordert in der Regel nur einige Zehntel Kubikzentimeter. Die Vergleichsbestimmung zur Ermittlung der Azidität von Substrat, Ferment und Puffer wird der beschriebenen Analyse nachgebildet; nur führt man nach Ablauf der Aktivierungszeit den Inhalt des Bestimmungskölbchens, den man mit 12 cm<sup>3</sup> Wasser und 25 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol nachspült, in das Titrationsgefäß über, um dann erst die Gelatinelösung hinzuzufügen; die Titration des Gemisches nach dem Zusatz des Indikators wird darauf, wie beschrieben, ausgeführt.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 161, S. 190. 1926.



Die Einheit der tryptischen Leistung „*T*-(*e*)“ ist nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz entsprechend dem Aziditätszuwachs von  $0,90 \text{ cm}^3$   $0,2 \text{ n}$ -Lauge zu setzen, gemessen unter den von Willstätter und Persiel angegebenen Bedingungen der Trypsinaktivierung und der Reaktion (vgl. S. 309) gefunden nach dem obigen Verfahren.

Bestimmung von Trypsin mit Kasein<sup>1)</sup>.

Die Hydrolyse des Kaseins durch das (aktivierte) Trypsin verläuft rascher und führt weiter als bei der Gelatine; das klumpige Ausfallen bei Alkoholzusatz fällt auch fort. Der mittlere Fehler der Bestimmung beträgt  $\pm 0,05 \text{ cm}^3$   $0,2 \text{ n}$ -KOH.

Ausführung der Bestimmung.

Die Fermentprobe von beispielsweise  $1 \text{ cm}^3$  Glycerinauszug 1 : 10 aus getrocknetem Pankreas oder äquivalenten Mengen einer anderen Lösung oder eines Trockenpräparates wird mit  $0,3 \text{ cm}^3$  Kinaselösung (Auszug 1 : 50 aus trockener Darmschleimhaut) und mit Wasser in einem Fläschchen mit eingeschliffenem Stopfen auf  $3,0 \text{ cm}^3$  gebracht und zur Aktivierung 30 Minuten bei  $30^\circ$  gehalten. Dann gibt man  $5,0 \text{ cm}^3$  6proz. Kaseinlösung und  $2,0 \text{ cm}^3$   $\text{n-HN}_3$ - $\text{NH}_4\text{C}$ -Puffer (1 : 1) hinzu. Nach der Reaktionszeit von 20 Minuten wird das Gemisch mit  $5 \text{ cm}^3$  Wasser und  $15 \text{ cm}^3$  absolutem Alkohol quantitativ in das Titriergefäß überspült und nach Zugabe von  $2 \text{ cm}^3$  0,5proz. alkoholischer Lösung von Thymolphthalein mit  $0,2 \text{ n}$ -KOH nur zum ersten schwach bläulichen Farbton titriert. Darauf fügt man  $120 \text{ cm}^3$  siedenden absoluten Alkohol hinzu und führt die Titration bis zum Auftreten des ersten grünlichblauen Farbtons zu Ende. Helles Tageslicht oder Bogenlampenlicht ist für die Beobachtung des Umschlagpunktes geeignet. Von der gefundenen Azidität ist der Alkaliverbrauch abzuziehen, der sich in genauen analytischen Vergleich für Kasein + Puffer und Fermentpräparat ergibt.

Als Trypsin-Einheit, gemessen am Kasein, bezeichnen Willstätter und Waldschmidt-Leitz diejenige Fermentmenge, die unter den angegebenen Bedingungen eine Spaltung entsprechend  $1,05 \text{ cm}^3$   $0,2 \text{ n}$ -KOH bewirkt. Diese Einheit ist der mit Gelatine bestimmten ungefähr äquivalent. Sie ist in etwa  $0,1 \text{ cm}^3$  Glycerinauszug (1 : 10) aus getrocknetem Pankreas enthalten.

In neuerer Zeit haben Graßmann und Heyde<sup>2)</sup> die alkalimetrische Bestimmung der Aminosäuren und Peptide als Mikromethode ausgearbeitet, wobei unter den angegebenen Bedingungen

<sup>1)</sup> Willstätter, Waldschmidt-Leitz, Dunaiturria und Künstler: l. c. S. 206.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 183, S. 32. 1929.

noch Mengen von  $\frac{4}{1000}$  Millimol-Aminosäure (z. B. 0,30 mg Glykoll) mit derselben relativen Genauigkeit bestimmt werden können, wie bei der Makrotitration, d. h. mit einem Fehler von kaum  $\pm 1\%$ . Man kann dabei fermentative Spaltungen im Gesamtvolumen von  $1 \text{ cm}^3$  genau durchführen und den Fortgang der Reaktion durch Titration von 0,2 und  $0,1 \text{ cm}^3$  Proben verfolgen.

Zur Durchführung der Versuche werden benötigt: 1. Genaue Meßkolben zu  $1 \text{ cm}^3$  Inhalt, aus Jenaer Glas, mit eingeschliffenem Stopfen, Gesamthöhe etwa  $3\frac{1}{2} \text{ cm}$ , Durchmesser des Halses innen  $0,4\text{--}0,5 \text{ cm}$ . 2. Kapillarmeißpipetten zu  $0,5$ ,  $0,2$  und  $0,1 \text{ cm}^3$  Inhalt (die letzteren in  $\frac{1}{1000} \text{ cm}^3$  unterteilt), mit dünn ausgezogener Spitze. 3. Erlenmeyerkolben von  $5$ ,  $10$  und  $15 \text{ cm}^3$  Inhalt. 4. Mikrobürette aus Jenaer Glas von  $35\text{--}40 \text{ cm}$  Skalenlänge und  $2 \text{ cm}^3$  Fassungsvermögen in  $\frac{1}{100} \text{ cm}^3$  abgeteilt. Tropfengröße bei alkoholischer Lauge  $0,005 \text{ cm}^3$ . Die Bürette ist auf den Hals einer  $500 \text{ cm}^3$  fassenden Vorratsflasche aufgeschliffen und gegen die Flasche durch einen sehr genauen, nicht gefetteten Hahn verschließbar. Gegen die Luftkohlensäure ist der Inhalt der Flasche und der Bürette durch Natronkalkrohre geschützt. 5. Maßflüssigkeit: eine  $\frac{1}{100} \text{ n}$ -Lösung von KOH in  $90\%$  reinem Alkohol. Es empfiehlt sich, die Lauge täglich gegen  $\frac{1}{10} \text{ n}$ -Säure zu prüfen.

Zur Titration versetzt man eine abgemessene Probe der zu untersuchenden Lösung, z. B.  $0,2 \text{ cm}^3$  mit 2 Tropfen einer  $0,1 \text{ proz.}$  alkoholischen Thymolphthaleinlösung und läßt die Lauge bis zur deutlichen Blaufärbung zufließen. Man fügt nun aus einer Pipette das 9fache Volumen der angewandten wässerigen Lösung (also z. B.  $1,8 \text{ cm}^3$ ) absoluten Alkohol zu, wobei die Blaufärbung wieder verschwindet und titriert zu Ende. Der richtige Endpunkt, der mit einer Genauigkeit von einem Tropfen erkannt werden kann, entspricht einer deutlichen hellblauen Färbung, ähnlich derjenigen einer  $\frac{1}{400}$ -molaren Kupferchloridlösung in überschüssigem Ammoniak, die als Vergleichslösung benutzt wird. Die Titration erfolgt beim Lichte einer 200kerzigen Tageslichtlampe in einem gegen Fremdlicht abgeblendeten und auf der Innenseite weiß ausgekleidetem Kasten.

#### Titrimetrische Bestimmung des Aminostickstoffs nach Linderstrøm-Lang<sup>1)</sup>.

Linderstrøm-Lang hat gezeigt, daß die meisten Aminosäuren, Dipeptide usw. unter Zugabe von Azeton ( $90\%$ ) und bei

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 173, S. 32. 1927. Auf die Mitteilung von Linderstrøm-Lang und Holter (Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 201, S. 9. 1931) über die Bestimmung kleiner enzymatischer Spaltungen kann nur hingewiesen werden.

Anwendung einer passenden Kontrolllösung glatt mit 0,1 n-alkoholischem HCl (90%) titriert werden können. (Genauigkeit 0,04 cm<sup>3</sup>.) Nicht titriert nach dieser Methode werden diejenigen Aminosäuren, deren Aminogruppen sehr schwache Basen (aromatische Aminosäuren) oder deren Säuregruppen sehr starke Säuren (Sulfonsäuren, Taurin) sind. Alle anderen Aminosäuren bzw. Aminosäuregruppen werden vollständig titriert. Keine der bei den enzymatischen Untersuchungen verwendeten Pufferlösungen haben einem störenden Einfluß auf die Titrierung. Bei in Azeton-Wassermischung (gewöhnlich 90% Azeton) schwerlöslichen salzsauren Salzen der Aminosäuren (z. B. beim Histidin, Lysin, in geringerem Grade beim Arginin) ist es vorteilhaft, wenn man die Hauptmenge der Salzsäure vor der Azetonzugabe zusetzt.

Als Indikator wird Naphthylrot (Benzol-azo- $\alpha$ -naphthylamin) benutzt. 0,1 g Indikator werden in 100 cm<sup>3</sup> 96proz. Alkohol aufgelöst und zur Titration 10 Tropfen dieser Lösung gebraucht. Der Indikator ist in basischer Flüssigkeit gelb, in saurer schön rot. Man benutzt das käufliche reine Azeton. Spez. Gewicht bei 19° C, 0,7954 (Gehalt zu 99%). Für 10 cm<sup>3</sup> Versuchsflüssigkeit wurden zu drei verschiedenen Titrationstadien 100—150—200 cm<sup>3</sup> verwendet. Die Salzsäure ist 0,1 n in 90proz. Alkohol.

*Vorschrift von Linderström-Lang zur Ausführung der Titration:* Die Titration wird zu zwei verschiedenen Indikatorfarben orange und rötlich ( $p_h$  5,1 bzw. 4,8 in Wasser) ausgeführt, gewöhnlich mit drei verschiedenen Azetonkonzentrationen: 100, 150 und 200 cm<sup>3</sup> Azeton zu 10 cm<sup>3</sup> Versuchsflüssigkeit. Bei jeder Titration wird eine Kontrolle hergestellt, bestehend aus 10 cm<sup>3</sup> Wasser, 10 Tropfen Indikatorlösung und der gewünschten Mengen Azeton. Die Indikatorfarben sind mit 0,53 cm<sup>3</sup> bzw. 1,10 cm<sup>3</sup> 0,1 n-HCl sicherzustellen. 250 cm<sup>3</sup> konische Kolben sind die bequemsten. Nach der Herstellung der Kontrolle werden 10 cm<sup>3</sup> Versuchsflüssigkeit abpipettiert, 10 Tropfen Indikator zugesetzt und die Titration wird angefangen, indem man so viel HCl zugibt, daß die wässrige Lösung deutlich rot wird. Dann wird ein Teil des Azetons darauf gegossen, und zwar nicht mehr, als daß die Lösung klar bleibt, und man titriert bis zu ein wenig röterer Farbe als der der Kontrolle. Man setzt nun den Rest des Azetons hinzu und titriert zur Farbe der Kontrolle, was mit einer Genauigkeit von 0,02—0,04 cm<sup>3</sup> 0,1 n-HCl geschehen kann.

Durch dieses Verfahren kann man bestimmen die Monamino-monokarbonsäuren, die Diamino-Monokarbonsäuren, die Monoamino-Dikarbonsäuren,<sup>†</sup> die Oxysäuren dieser Gruppen, Prolin und Oxyprolin zu 100%, Asparagin und Arginin, Tryptophan, Di-

peptide zu 50%, Kreatin, Guanidin zu 33,3%, Histidin zu 66,6% des gesamten Stickstoffs.

### 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 Natriumkaseinatlösungen 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% gesetzt wird, da sie noch das ganze ungespaltene Eiweiß enthält — verglichen. Die Spaltung wird in Prozenten ausgedrückt.

Erforderliche Lösungen. Kaseinlösung. Diese wird durch Lösen von 5 g Kasein (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 Kasein im Versuchssystem durch die Zugabe von Puffern völlig klar löst.

Versuchspuffer. Als Puffer, der dem System zugesetzt wird, ist je nach der gewünschten Azidität 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 Azidität der Lösung durch einen noch stärker konzentrierten andern Puffer nach der Spaltung auf die für die Analyse notwendige Azidität 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.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 169, S. 320. 1926. Vgl. auch Klin. Wochenschr. Bd. 6, S. 1174. 1927.

Als Vorlagepuffer, der die Entnahmen auf den für die Analyse notwendigen  $p_h$  zu bringen hat, werden m/15-Phosphatpuffer verwendet. Die Azidität der Lösungen, die für die Analyse etwa 7,8 sein soll, wird bei einer Spaltungsazidität 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 Spaltungsaziditäten ist es notwendig, einen anderen Vorlagepuffer anzuwenden, um bei der Bestimmung in den Lösungen eine Azidität von ca. 7,78 zu erzielen.

So wurden bei einer Spaltungsazidität von 5,76 ein Vorlagepuffer vom  $p_h$  8,02 verwandt und in der Mischung 7,78 erreicht, bei einer Spaltungsazidität 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 Aziditäten 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 heißgesättigte 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 Aufschlammungen von Pankreatin Rhenania oder Pankreasdispert (Krause) in einer Konzentration 1:20 mit Aqua dest. Die Aufschlammung 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 Kaseinlösungen 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 Kaseinlösungen 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 Ei-

weißlösungen 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> Kaseinlösung, 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 Temperaturausgleich 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 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 Azidität 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

---

<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.

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. 37) 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. 253) gibt folgende Tabelle Aufschluß.

— = keine nachweisbare, + = positive, ++ = verstärkte Hydrolyse.

Substrat	Erepsin	Trypsin	Trypsin + Enterokin.
1. Alanylglyzin . . . . .	+	—	—
2. Glyzyltyrosin . . . . .	+	—	—
3. Glyzylglyzin . . . . .	+	—	—
4. Glyzylalanin . . . . .	+	—	—
5. Leuzylglyzin . . . . .	+	—	—
6. Leuzylalanin . . . . .	+	—	—
7. Leuzylglyzylglyzin . . . . .	+	—	—
8. Pepton (ex albumine, Merck)	—	+	++
9. Klupein . . . . .	—	+	++
10. Thymushiston . . . . .	—	+	++
11. Kasein . . . . .	—	—	+
12. Fibrin . . . . .	—	—	+
13. Gelatine . . . . .	—	—	+
14. Gliadin . . . . .	—	—	+
15. Zein . . . . .	—	—	+

### Trennung von Trypsin und Enterokinase.

Waldschmidt-Leitz<sup>2)</sup> hat nachgewiesen, daß die Wirkung der Enterokinase auf Trypsin nicht als enzymatischer Prozeß, sondern

<sup>1)</sup> Waldschmidt-Leitz und Harteneck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 149, S. 207. 1925.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 181. 1923; Bd. 142, S. 217. 1924. Über Bestimmung von Trypsin und Enterokinase vgl. auch Linderström-Lang und Steenberg: C. r. Trav. Labor. Carlsberg Bd. 17, S. 1. 1929

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. 278, 308). 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>1)</sup>. Vom obersten etwa 1 m langen Abschnitt des Schweinedünndarmes möglichst vieler Tiere schabt man die innerste weiche Schleimhaut mit dem Messer oder besser mit einer Glasplatte so vorsichtig ab, daß sie möglichst frei von Bindegewebe und Muskelfasern ist; die Masse wird mit der dreifachen Menge Azeton gut durchgeschüttelt und nach 2 stündigem Stehen filtriert. Der Filtrerrückstand wird dann weiter durch Schütteln mit der dreifachen Menge Azeton und Filtrieren, darauf mit der  $1\frac{1}{2}$ -fachen Menge Azeton und  $1\frac{1}{2}$ -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 (etwa  $\frac{1}{7}$  vom Frischgewicht) 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>2)</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 alkalischen Reaktion unterworfen. Die so gewonnene Kinase ist

(Weitgehende Reinigung der Enterokinase). — Über Erepsin-, Trypsin-, Trypsin-Kinase-Komplex vgl. Abderhalden und Mitarbeiter. Fermentforschung Bd. 10, S. 173, 490, 532—610. 1928; Bd. 11, S. 45—119. 1929.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 181, 204, 235. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 217 (223).



erepsinfrei. Damit ist ein Verfahren zur Trennung von Kinase und Erepsin gegeben.

Die Kinase ist relativ gut (ca. 8 Tage) in wässriger Lösung bei neutraler Reaktion und Glycerinzusatz haltbar. Die Lösungen können ohne meßbare Einbuße an Aktivität zur Trockene eingengt werden. 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. 5) adsorbiert und das einmal mit 20 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschene Adsorbat mit 40 cm<sup>3</sup> von „Ammoniumphosphat“ (57 Vol. 1proz. Diammonphosphatlösung, 3 Vol. n-NH<sub>3</sub> und 40 Vol. 87proz. Glycerin) 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 (s. o.) 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 bereiteten und von überschüssigem NH<sub>3</sub> befreiten Kinaseauszug (aus 3 g getrockneter Schleimhaut) versetzte er zunächst mit 7,5 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure. Aus dem Filtrat schlug er die Kinase durch Zusatz von 2 l 96proz. Alkohol nieder und

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 236. 1923.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 238. 1924.

löste die Fällung nach dem Filtrieren in 180 cm<sup>3</sup> 45 proz. 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 6 cm<sup>3</sup> 2 proz. Gerbsäurelösung gefällt (wobei ein Teil des Aktivators mit den Begleitstoffen niedergeschlagen wurde) und zentrifugiert.

Die Mutterlauge (265 cm<sup>3</sup>) wurde in der Zentrifuge abgetrennt. Nach dem Neutralisieren des noch saueren Auszugs mit 4,7 cm<sup>3</sup> n-NH<sub>3</sub> adsorbierte er die Kinase mit 5,3 cm<sup>3</sup> Tonerdesuspensionpräparat C (0,0875 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und eluierte aus dem Adsorbat durch Behandlung mit 120 cm<sup>3</sup> 1/30 n-Phosphatmischung ( $p_h = 7,0$ ; 43% Glycerin enthaltend). Die mit 15 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure angesäuerte Elution (225 ccm) unterwarf er einer weiteren Adsorption durch 50 cm<sup>3</sup> einer Aufschlammung von elektroosmotisch gereinigtem Kaolin (2,83 g) und eluierte das Adsorbat mit 100 cm<sup>3</sup> 0,05 n-Ammoniak, welches 43% Glycerin enthielt.

Die auf der Nutsche mittels Kieselgur geklärte Elution unterwarf er 6 $\frac{1}{2}$  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.

Darstellung von enterokinasefreiem Trypsin nach Waldschmidt-Leitz und Linderström-Lang<sup>1)</sup>.

Waldschmidt-Leitz hat sein früher beschriebenes Verfahren zur Gewinnung kinasefreier Lösungen von Trypsin<sup>2)</sup> als zu verlustreich verbessert. Das abgeänderte Verfahren beruht auf der spezifischen Adsorption von Trypsin-Kinase an einen in der Fermentlösung selbst gebildeten Niederschlag von Kasein. Die Ausfällung des Substrates muß in den Fermentlösungen selbst vorgenommen werden, am vorteilhaftesten in etwas gealterten Auszügen. Die Bindung der Trypsin-Kinase an das aus den Fermentlösungen gefällte Kasein ist spezifisch; sie betrifft nur das aktivierte und gar nicht das nicht aktivierte Ferment. Durch mehrmalige Anwendung der Fällung mit Kasein, zweckmäßig bei  $p_h$  5,2, erreicht man, daß das Trypsin in guter Ausbeute und frei von Trypsin-Kinase in den Mutterlaugen verbleibt. Um es in proteolytisch einheitlichem Zustande zu gewinnen, befreit man es dann nach den Angaben von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck noch vom beigemengten Erepsin (vgl. S. 324).

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 166, S. 241. 1927.

<sup>2)</sup> Waldschmidt-Leitz, Schöffner und Graßmann: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 156, S. 68 (84). 1926.

Beispiel für die Darstellung von enterokinase- und erepsinfreiem Trypsin (l. c. S. 245).

20 cm<sup>3</sup> Glyzerinauszug aus Pankreas, enthaltend 140 T.-(e.), wurden mit 20 cm<sup>3</sup> 6proz. Kaseinlösung (Hammarsten) versetzt, in Kältemischung abgekühlt und nach etwa 5 Minuten durch Zusatz von 2,8 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure unter Umschütteln gefällt; 22 cm<sup>3</sup> der von der Fällung sogleich durch Filtration getrennten Mutterlauge fing man in 10 cm<sup>3</sup> 6proz. gekühlter Kaseinlösung auf und fällte sie erneut durch sofortigen Zusatz von 1,2 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure; 15 cm<sup>3</sup> der wiederum durch Filtration vom Niederschlag getrennten und mit 10 cm<sup>3</sup> 6proz. kalter Kaseinlösung vermischten Mutterlauge befreite man durch Zusatz von 1,2 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure und Filtration von den letzten Anteilen Trypsin-Kinase. Sie enthielt dann in 25 cm<sup>3</sup> 35,8 T.-(e.) aber keine nachweisbare Menge Trypsin-Kinase mehr. Ausbeute an Trypsin 95%.

13 cm<sup>3</sup> der kinasefreien Lösung behandelte man dreimal mit je 0,5 cm<sup>3</sup> Tonerdesuspension C  $\gamma$  (= je 8,9 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und trennte in der Zentrifuge von den Adsorbaten. Die erhaltene Adsorptionsmutterlauge (13 cm<sup>3</sup>) war frei von Trypsin-Kinase und von Erep-sin und enthielt noch insgesamt 11,4 T.-(e), d. i. 62% der vor der Abtrennung des Erep-sins gemessenen Trypsinmenge.

Ein Verfahren zur Gewinnung erepsinfreier Enterokinase nach E. Waldschmidt-Leitz und G. Künstner<sup>1)</sup> besteht in der Fällung der frisch bereiteten und mit Essigsäure vorbehandelten alkoholischen Auszüge aus Darmschleimhaut durch Quecksilberchlorid; in den durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreiten Mutterlaugen der Sublimatfällung verbleibt dann die Kinase in erepsinfreier Form. Dieses Verfahren ist nur bei der Verarbeitung ganz frisch bereiteter Kinaseauszüge anwendbar.

Beispiel für die Gewinnung erepsinfreier Enterokinase nach Waldschmidt-Leitz und G. Künstner. 10,0 cm<sup>3</sup> frisch bereiteter Auszug aus getrockneter Darmschleimhaut<sup>2)</sup> enthielten zufolge der Bestimmung neben reichlichen Mengen Enterokinase (0,30 cm<sup>3</sup>, 0,10 cm<sup>3</sup> Pankreasglyzerinauszug mit 0,80 T.-(e), 1/2 Stunde behandelt: 20 Min. bei 30° [Kasein]: 0,90 cm<sup>3</sup> 0,2 n-KOH Aziditätszuwachs entsprechen 0,80 T.-(e)) 0,00126 Erep-sineinheit (5,0 cm<sup>3</sup>, 2 Stunden Leuzylglyzin: 0,80 cm<sup>3</sup> 0,2 n-KOH; 0,000631 Er.-E.). Man unterwarf sie einer Vorreinigung durch Behandlung mit 0,5 cm<sup>3</sup> n-Essigsäure und fällte die vom Niederschlag mittels der Zentrifuge abgetrennte Lösung mit 1,0 cm<sup>3</sup> 1proz. Sublimat;

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 171, S. 290 (299). 1927.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu Waldschmidt-Leitz: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 217 (224). 1924/5.

die vom Quecksilberniederschlag abzentrifugierte Mutterlauge befreite man durch Einleiten von Schwefelwasserstoff und Filtration vom überschüssigen Quecksilber und durch Verdunsten im Faust-Heimschen Apparat vom Schwefelwasserstoff. Sie enthielt, mit Wasser auf 12,5 cm<sup>3</sup> aufgefüllt, noch ausreichende Menge Aktivator, aber kein Erepsin mehr (0,50 cm<sup>3</sup>, 0,10 cm<sup>3</sup> Pankreasglyzerinauszug mit 0,80 T.-(e); 1/2 Stunde behandelt: 20 Min. bei 30° [Kasein]: 0,90 cm<sup>3</sup> 0,2 n-KOH entsprechen 0,80 T.-(e)) (5,0 cm<sup>3</sup>, 2 Stunden [Leuzylyglyzin]: 0,00 cm<sup>3</sup> 0,2 n-KOH).

### 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 7 tägige 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 1/2 stündiger Einwirkung bei 30° eine tryptische Wirkung entsprechend einer Aziditätszunahme von 0,90 cm<sup>3</sup> 0,2-n erteilte.

### Erepsin.

Das Ferment der Darmschleimhaut, das von Cohnheim gefunden und von ihm Erepsin genannt wurde, wirkt nach Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz<sup>3)</sup> nur auf Peptide. Weder Pepton der peptischen Verdauung, noch Protamin oder

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 142, S. 219. 1924.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 132, S. 226. 1924.

<sup>3)</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.

Histon, noch Kasein, Fibrin, Gelatine, Gliadin oder Zein sind durch Erepsin zerlegbar (vgl. Tabelle auf S. 317). — 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 zugrunde liegende 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>1)</sup>. Er bediente sich zur Darstellung des Erepsins der fraktionierten Aussalzung mit Ammonsulfat nach Jakob<sup>2)</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>3)</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.

Man beachte jedoch, 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<sup>4)</sup>.

Beispiel: 100 g frische Darmschleimhaut vom Schwein werden gründlich gewaschen, abgeschabt und in der Reibschale mit

1) Cohnheim: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 33, S. 451. 1901.

2) Jakob: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 30, S. 135. 1900.

3) Raubitschek: Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 4, S. 675. 1907.

4) Waldschmidt-Leitz u. Schöffner: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 151, S. 44. 1925.

500 cm<sup>3</sup> 87proz. Glycerin gut verrührt. Diese Glycerinsuspension ist monatelang haltbar und dient als Ausgangspräparat. 50 cm<sup>3</sup> dieser Aufschlammung verdünnt man nach 1tägigem Stehen bei Zimmertemperatur mit 150 cm<sup>3</sup> Wasser und schleudert sie in der Zentrifuge ab. Die Ausbeute ist viel höher als im wässrig alkoholischen Auszug.

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 versetzt; die auf 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>.

Darstellung aus der Pankreasdrüse s. unten.

#### Trennung von Trypsin und Erepsin nach Waldschmidt-Leitz<sup>2)</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>3)</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-Azetatpuffer von  $p_H$  4,7 mittels 6,0 cm<sup>3</sup> Tonerdesuspension C (vgl. S. 5) (= 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% Glycerin enthaltend) eluiert. Ausbeute an Trypsin in der Mutterlauge 74%, in der Elution 0%; an Erepsin in der Mutterlauge 64%, in der Elution 34%. —  $\frac{2}{3}$  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>

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 151, S. 47. 1926.

<sup>2)</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>3)</sup> Waldschmidt-Leitz u. A. Harteneck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 147, S. 306. 1925.

glyzerinhaltigem 0,04 n-NH<sub>3</sub> eluiert. — Ausbeute an Erepsin in der Mutterlauge 54<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, in der Elution 47<sup>0</sup>/<sub>0</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>0</sub>, in der Elution 0<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; an Erepsin in der Mutterlauge 0<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, in der Elution 60<sup>0</sup>/<sub>0</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 enzymatischen Individuen zurückzuführen. Auch durch Kaolin wird das Erepsin bei saurer Reaktion ( $p_h$  4,7) gut adsorbiert und seine Freilegung aus dem Adsorbat gelingt durch alkalisches Phosphat ( $p_h$  8,2) in guter Ausbeute.

#### Nachweis und Bestimmung.

Cohnheim<sup>1)</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 lufttrockenen 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<sup>o</sup>, weitere 19 Tage bei Zimmertemperatur der Verdauung überlassen. Man filtriert, befreit das Filtrat von Oxalsäure mit kohlensaurem 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

<sup>1)</sup> Cohnheim: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 33, S. 451. 1901.

mit gekochtem Ferment erhält man die starke Rotfärbung der positiven Biuretprobe<sup>1)</sup>.

Waldschmidt-Leitz führt die Bestimmung des Darmerepsins bei der optimalen Wasserstoffzahl ( $p_h$  7,8) aus. Zugrunde liegt ihr die Einwirkung des Enzyms auf Glyzylglyzin, dessen Hydrolyse durch die alkalimetrische Messung der freigelegten Karboxyle in 85 proz. methylalkoholischer Lösung verfolgt wird<sup>2)</sup>.

Ausführung der Bestimmung. 0,1320 g Glyzylglyzin = 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. Thymolphthaleinlösung in Alkohol + 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. 306, 310). — Man hat zu jeder Bestimmung eine Leeranalyse auszuführen, deren Alkaliverbrauch von dem des Hauptversuchs in Abzug zu bringen ist; der verbleibende Aziditätszuwachs entspricht dann der entstandenen Menge Glykokoll.

Die Wirkung des Pankreaserepsins wird durch Hydrolyse von dl-Leuzylylin bei  $p_h$  7,8 verfolgt<sup>3)</sup>. Beispiel: 0,1882 g dl-Leuzylylin (0,001 Mol) werden in 5,00 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{5}$  mol Phosphatpuffer von  $p_h$  7,8 gelöst, sonst wie oben verfahren.

Darstellung des Leuzylyglyzins nach E. Fischer (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·CH·CH<sub>2</sub>·CH(NH<sub>2</sub>)·CO·NH·CH<sub>2</sub>·COOH. 10 g Glykokoll werden in 133 cm<sup>3</sup> (1 Mol.) Normalnatronlauge gelöst und unter Kühlen mit Eis und kräftigem Schütteln abwechselnd 170 cm<sup>3</sup> gekühlte Normalnatronlauge und 37 g (1 Mol.)  $\alpha$ -Bromisokapronylbromid in 4 Portionen zugeführt, wobei mit der erneuten Zugabe erst fortzufahren ist, wenn der Säurebromidgeruch verschwunden ist. Der ganze Prozeß dauert etwa 20 Minuten. Die von einer geringen Menge Öl abfiltrierte Flüssigkeit wird nun mit 35 cm<sup>3</sup> fünffach Normalsalzsäure versetzt, das ausfallende Öl ausgeäthert, und das Kon-

<sup>1)</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.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 151, S. 42. 1926.

<sup>3)</sup> Waldschmidt-Leitz und Harteneck: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 147, S. 286. 1925.



densationsprodukt mit viel Petroläther aus der eingeeengten ätherischen Lösung gefällt. Das bald kristallinisch erstarrende Produkt, das  $\alpha$ -Bromisokapronylglyzin,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CHBr}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$ , wird abgesaugt, mit Petroläther gewaschen und aus heißem Wasser oder Chloroform umkristallisiert. Schmelzpunkt  $133^\circ$ . Ausbeute an reinem Präparat etwa 26 g, und wenn die Mutterlaugen verarbeitet werden, 29 g. Man kann auch die Hauptmenge des Rohprodukts sofort kristallinisch erhalten, indem man die alkalische Lösung erst schwach ansäuert, dann einige vorher bereitete Kristalle einträgt und unter stetem Rühren den Rest der Salzsäure langsam zufügt.

Das  $\alpha$ -Bromisokapronylglyzin wird zur Umwandlung in das Leuzylglyzin in der fünffachen Menge etwa 25proz. Ammoniak gelöst, und die Lösung vier Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der beim Einengen des Reaktionsproduktes auf dem Wasserbade entstehende Kristallbrei von Ammoniumbromid und Dipeptid wird mit absolutem Alkohol übergossen und nochmals abgedampft. Der Rückstand wird nun mit Alkohol aufgeköcht, nach dem Erkalten das in Alkohol unlösliche Leuzylglyzin abgesaugt und so lange mit Alkohol gewaschen, bis eine Probe der Substanz in Wasser gelöst mit Silbernitrat keine Fällung mehr gibt. Zur Reinigung wird das Dipeptid in der 15fachen Menge Wasser heiß gelöst, wobei sich in der Kälte etwa die Hälfte des Produktes kristallinisch abscheidet. Durch Einengen der Mutterlauge und Füllen mit Alkohol läßt sich der Rest gewinnen. Schmelzpunkt unter Zersetzung gegen  $243^\circ$ . Ausbeute  $80\%$  der Theorie. Das Produkt darf kein Brom mehr enthalten.

Darstellung von dl-Alanyl-Glyzin. 10 g Glykokoll werden in  $134\text{ cm}^3$  (1 Mol.) n-NaOH in einer Stöpselflasche gelöst, in einer Kältemischung recht stark gekühlt und unter kräftigem Schütteln werden 34 g (1,2 Mol.)  $\alpha$ -Brompropionylbromid und  $200\text{ cm}^3$  (1,5 Mol.) ebenfalls stark gekühlter n-NaOH abwechselnd in je acht Portionen zugefügt. Hierbei wird jedesmal mit der Zugabe erst fortgefahren, wenn der Säurebromidgeruch verschwunden ist. Das Eintragen dauert etwa  $1\text{—}1\frac{1}{2}$  Stunden.

Nach dem Verschwinden des Säurechloridgeruches versetzt man sofort mit  $40\text{ cm}^3$  fünffach n-HCl und verdampft unter stark vermindertem Druck zur Trockne. Der Rückstand wird mehrmals mit warmem Äther extrahiert; die vereinigten Ätherauszüge werden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert, eingeeengt und mit Petroläther versetzt. Hierbei fällt das  $\alpha$ -Brompropionylglyzin zunächst ölig aus, kristallisiert aber beim längeren Stehen in einer Kältemischung oder noch rascher beim Impfen. Es wird mit Petroläther gewaschen (Ausbeute  $92\%$  der Theorie). Die Umkristallisation erfolgt in heißem Chloroform (Schmp.  $104^\circ$ ).

Zur Verwandlung in dl-Alanylglyzin löst man in einer Stöpselflasche das  $\alpha$ -Brompropionylglyzin in einer 25proz. wässrigen Ammoniaklösung und läßt vier Tage bei Zimmertemperatur stehen und verdampft auf dem Wasserbade zur Trockne (zuletzt unter Zusatz von etwas Alkohol, um alles Wasser zu entfernen). Der Rückstand wird mit absolutem Alkohol ausgeköcht, bis er kein Brom mehr enthält; hierbei geht das Bromammonium in Lösung. Das Dipeptid wird in möglichst wenig heißem 50proz. Alkohol gelöst und die filtrierte Lösung heiß mit absolutem Alkohol bis zur Trübung versetzt. Bei längerem Stehen kristallisiert das Alanyl-Glyzin fast vollständig in weißen, kurzen Nadelchen aus (Ausbeute  $87\%$  der Theorie. Schmilzt beim raschen Erhitzen unter Bräunung bei  $235^\circ$  korr.<sup>1)</sup>).

<sup>1)</sup> Fischer: Liebigs Annalen der Chemie Bd. 340, S. 123. 1905.

Darstellung von Glyzyl-Glyzin. 25 g Glykokollaethylester werden unter Abkühlung mit 15 g Wasser versetzt und bei Zimmertemperatur 1—2 Tage stehen gelassen. Dabei fällt das Glyzinanhydrid als schön kristallisierte Masse aus. Es wird abfiltriert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen (Ausbeute etwa 67% der Theorie).

5 g gepulvertes Glyzinanhydrid werden durch Schütteln in 50 cm<sup>3</sup> n-NaOH bei Zimmertemperatur gelöst. Nach 15—20 Minuten ist die Umwandlung zu Glyzyl-Glyzin vollzogen. Neutralisiert man jetzt mit 50 cm<sup>3</sup> n-HCl und engt die Flüssigkeit unter vermindertem Druck auf wenige Kubikzentimeter ein, so scheidet sich das Glyzyl-Glyzin als farblose Kristallmasse ab. Es wird abfiltriert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen; dann löst man es in wenig siedendem Wasser auf, versetzt die heiße Lösung mit Alkohol bis zur beginnenden Trübung, läßt sie erst stehen, kühlt sie dann auf 0°, saugt die ausgeschiedene Kristallmasse ab und wäscht sie erst mit Alkohol und dann mit Äther aus (Ausbeute ca. 3 g). Beim raschen Erhitzen färbt sich die Substanz erst dunkel und zersetzt sich dann ohne zu schmelzen zwischen 215° und 220°<sup>1)</sup>).

Die Fermentmenge ist für eine Bestimmung so zu wählen, daß die (nach dem monomolekularen Verlauf berechnete) Reaktionskonstante zwischen 0,005 und 0,0005 liegt. Die Messung soll nicht über eine 60proz. 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-Leuzin. Der Nachweis dieses Abbaus von Peptiden kann bequem mittels Polarimetrie bestimmt werden<sup>3)</sup>. Aus dem beobachteten Drehwert läßt sich die Menge des gespaltenen Peptids berechnen. Es gilt die Beziehung  $\alpha = (1 - m)\alpha_0 + m\alpha_E$ , worin  $\alpha$  die jeweils beobachtete Drehung,  $\alpha_0$  die beobachtete oder berechnete Anfangsdrehung,  $\alpha_E$  die für vollkommene Spaltung beobachtete oder berechnete Enddrehung und  $m$  den umgesetzten Anteil des Substrates bedeutet. Daraus ergibt sich:

$$\frac{\text{umgesetztes Substrat}}{\text{angewandtes Substrat}} = m = \frac{\alpha - \alpha_0}{\alpha_E - \alpha_0}.$$

<sup>1)</sup> E. Fischer und E. Fourneau: Ber. 34, S. 2868. 1901; E. Fischer: Ber. 38, S. 605. 1905.

<sup>2)</sup> Abderhalden: Fermentforschung Bd. 7, S. 61. 1923.

<sup>3)</sup> Über die Anwendung der Refraktometrie und Interferometrie zur Verfolgung des fermentativen Abbaus vgl. S. 28, 34,

Polarimetrische Methode nach Abderhalden und Koelker<sup>1)</sup>. Sie ließen auf Dipeptide, die die Ebene des polarisierenden Lichtes schwach drehen, das Ferment einwirken, wobei das Dipeptid in optisch aktive Komponenten gespalten wird. Als Substrat dienten d-Alanyl-d-Alanin und d-Alanyl-l-Leuzin (letzteres ist weniger geeignet), die nach E. Fischers Vorschrift dargestellt wurden<sup>2)</sup>.

Das eigentliche Polarimeterrohr war von einem Metallmantel umgeben, 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°

### Manometrische Messung der Peptidspaltung nach Krebs und Donegan<sup>3)</sup>.

Prinzip. Peptide sind stärkere Säuren als die Aminosäuren, aus denen sie aufgebaut sind. Daher werden Peptidlösungen bei der Spaltung der Peptide alkalischer; löst man Peptide in Ringerlösung von physiologischem Bikarbonat- und Kohlensäure-

<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> Biochem. Zeitschr. Bd. 210, S. 7. 1929. Vgl. auch Krebs in Abderhaldens Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden. Abt. IV, Teil 1, S. 871. 1931.



Sind  $h_I$  und  $h_{II}$  die in Gefäß *I* und *II* gemessenen Drucke, so ist der bei der Spaltung der zugegebenen Peptidmenge auftretende Druck  $h = h_{II} - h_I$ . Es ergibt sich, daß die reagierende Peptidmenge der Änderung des Kohlensäuredrucks bei geeigneter Anordnung nahezu proportional ist, so daß man schreiben kann  $x = kh$ , wo  $x$  die Peptidmenge bedeutet. Der Proportionalitätsfaktor ist die „Gefäßkonstante für Dipeptid“, mit dem ebenso wie mit  $k_{O_2}$  und  $k_{CO_2}$  (vgl. S. 240) gerechnet werden kann.

$k_{\text{Dipeptid}}$  ist abhängig von der Zusammensetzung der Versuchslösung, von den Gefäßabmessungen und von der Temperatur, aber unter geeigneten Bedingungen praktisch fast unabhängig von der Änderung des Kohlensäuredrucks. Hat man daher für die Bedingungen, unter denen man arbeitet,  $k_{\text{Dipeptid}}$  durch den Versuch gemessen, so kann man durch Messung des bei der Spaltung auftretenden Drucks  $h$  die gespaltene Peptidmenge ( $x_{\text{Dipeptid}}$ ) nach der Gleichung berechnen:

$$x_{\text{Dipeptid}} = h \cdot k_{\text{Dipeptid}}$$

Beispiel für Messung von  $k_{\text{Dipeptid}}$  (vgl. Krebs und Donegan: l. c. S. 12).

Lösungen: 1. Alanylglyzin in Wasser, 5000 mm<sup>3</sup> Alanylglyzin pro Kubikzentimeter. 2. Alanin und Glykokoll in Wasser, je 5000 mm<sup>3</sup> pro Kubikzentimeter. 3. Ringerlösung (vgl. S. 238) mit Alanylglyzin.  $B_0$  (Konzentration des Bikarbonats am Beginn des Versuches. Vgl. S. 246) 695 mm<sup>3</sup>,  $c_{\text{Alanylglyzin}} = 500$  mm<sup>3</sup> pro Kubikzentimeter.

Tabelle.  
Gasgemisch: 5,61<sup>0</sup>/<sub>0</sub> CO<sub>2</sub> in Argon. Temperatur 37,5<sup>0</sup>.

Gefäß-Nr.	1	2	3	4
Anhang . . .	0,203 cm <sup>3</sup> Lösung 1	0,1015 cm <sup>3</sup> Lösung 1 0,1015 cm <sup>3</sup> Wasser	0,203 cm <sup>3</sup> Lösung 2	0,1015 cm <sup>3</sup> Lösung 2 0,1015 cm <sup>3</sup> Wasser
Hauptraum .	6,04 cm <sup>3</sup> Lösung 3	6,04 cm <sup>3</sup> Lösung 3	6,04 cm <sup>3</sup> Lösung 3	6,04 cm <sup>3</sup> Lösung 3
$v_g$ (cm <sup>3</sup> )	4,67	4,68	4,15	4,02
$v_F$ (cm <sup>3</sup> )	6,24	6,24	6,24	6,24
Druck- änderung nach Einkippen	+ 136 ( $h_I$ )	+ 64 ( $h_I$ )	+ 3 ( $h_{II}$ )	— 4 ( $h_{II}$ )

glyzin entsteht, in Gefäß *II* der Druck, der bei Zugabe der äquivalenten Mengen von Alanin und Glykokoll entsteht. Der Gasraum der Gefäße enthält ein Gasgemisch mit einigen Vol.-<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Kohlensäure.

Daraus folgt:

$$h_1 = -136 + 3 = -133 \text{ für } x_1 = -1015 \text{ und } \frac{x_1}{h_1} = \frac{1015}{133} = 7,63,$$

$$h_2 = -64 - 4 = -68 \text{ für } x_2 = -507,5 \text{ und } \frac{x_2}{h_2} = \frac{507,5}{68} = 7,47.$$

Bei der Messung der Peptidspaltung ist zu beachten, daß die Konstante nur für die bei der Messung der bestehenden Versuchsbedingungen streng gültig ist. Man beschickt daher das Versuchsgefäß bei der Messung der Konstanten ebenso wie bei der Messung der Peptidspaltung mit dem Unterschied, daß bei der Messung der Konstanten an Stelle der Fermentlösung die gleiche Menge des fermentfreien Lösungsmittels in den Hauptraum eingefüllt wird. Nachdem die Versuchsflüssigkeit mit dem kohlen-säurehaltigen Gasgemisch gesättigt und das Versuchsgefäß gegen die äußere Atmosphäre abgeschlossen ist, wird das Peptid aus dem Anhang in den Hauptraum hineingespült. Dann schüttelt man 10 bis 20 Minuten zwecks Temperatur- und Druckausgleichs im Thermostaten und mißt die Druckänderung in üblicher Weise.

### 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 Mazerationssaft. Nach Salkowski<sup>1)</sup> wird das 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>2)</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-, Azetat- usw. Puffer zur Herstellung gewünschter H-Ionenkon-

<sup>1)</sup> Salkowski: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 63, S. 136. 1909. Vgl. auch Kikkoji, T.: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 63, S. 109. 1909.

<sup>2)</sup> Rona u. Mislowitzer: Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 517. 1923; Bd. 146, S. 1 u. 26. 1924. Vgl. auch Utkin-Ljubowzow und Steppuhn in Abderhaldens Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden. Abt. IV, Teil 1, S. 855. 1931.

zentrationen. Das Optimum liegt bei  $p_h$  3,6—3,8) aufgekocht und in sterile Erlenmeyerkölbchen von etwa  $50 \text{ cm}^3$  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  $150 \text{ cm}^3$  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  $4 \text{ cm}^3$  entnommen, in einem Becherglas mit  $20 \text{ cm}^3$  destilliertem Wasser vermischt, gegen Neutralrot neutralisiert und dann kurz aufgekocht. Nach erfolgter Koagulation werden  $5 \text{ cm}^3$  einer zehnfach verdünnten 5%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. 334).

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. 339).

Die zu analysierenden Rest-N-Mengen wurden in ihrer Größenanordnung so bemessen, daß sie stets das 10—20fache des blinden Stickstoffs ausmachten. Der gesamte Reststickstoff war das Maß für den Fortschritt der Autolyse. Als Reststickstoff wird derjenige N betrachtet, der nach der Hitzeagulation 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  $125 \text{ cm}^3$  destilliertes Wasser. In  $5 \text{ cm}^3$  dieser Suspension sind 1,21 mg „Anfangs“-Rest-N. In je 7 Kolben werden je  $10 \text{ cm}^3$

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-Azetatgemisch. 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<sub>h</sub>-Bestimmung.

Ein Versuchsbeispiel für die N-Verteilung:

Leberbrei. p<sub>h</sub> = 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
NH <sub>3</sub> -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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unter Zusatz von Kaliumsulfat und Kupfersulfat in Ammoniak übergeführt, das von der überschüssigen H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gebunden wird. Durch Zusatz von überschüssigem Alkali wird das Ammoniak freigemacht und mit Wasserdampf in eine titrierte Schwefelsäurevorlage überdestilliert. Die überschüssige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> der Vorlage wird zurücktitriert. Durch Ausfällung 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>2)</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. 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. 98)

<sup>1)</sup> Prozent vom Gesamt-N.

<sup>2)</sup> Bang, J.: „Mikromethoden“. 2. Aufl. S. 22. 1920. Zu Makro- und Halb-Mikro-Stickstoffbestimmung vgl. Prakt. II, S. 418 und 422.



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 Titriersäure 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.; etwa 6 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 (am besten mit Phosphorsäure) 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 Kochkolben gestellt und der Inhalt desselben

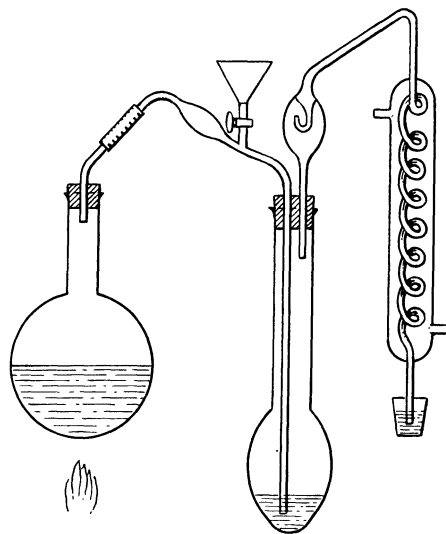


Abb. 98.

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 aber 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 cm<sup>3</sup> 5proz. Kaliumjodidlösung und 0,1 cm<sup>3</sup> — 2 Tropfen — 4proz. Kaliumjodatlösung<sup>1)</sup> und 5 Min.

<sup>1)</sup> Die Titriersäure kann schon vorher mit dem KJO<sub>3</sub> versetzt werden: man gibt 5,0 cm<sup>3</sup> 1/10-n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 20 cm<sup>3</sup> 1/10-n-KJO<sub>3</sub> in einen 100-cm<sup>3</sup>-Meßkolben und füllt bis zur Marke auf.

später 2—3 Tropfen Stärkelösung<sup>1)</sup>. Man titriert mit 1/200-n-Thiosulfatlösung bis farblos (1 cm<sup>3</sup> Säure = 0,07 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. 99 zeigt, benutzt<sup>2)</sup>. Es wird eine Waschflasche

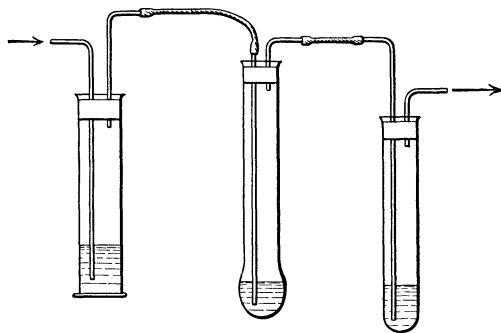


Abb. 99.

mit konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vorgeschaltet (Abb. links). Die Veraschung geschieht, wie oben beschrieben. Die Vorlage wird wieder mit der abgemessenen Menge H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beschickt. Dann wird die Saugpumpe angestellt. Man löst die

Verbindung zur Waschflasche und gibt durch einen

Trichter die 33proz. NaOH zum Austreiben des NH<sub>3</sub> 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° stellen, während man die Vorlage mit fließendem Wasser kühlt.

#### Anhang: Enteiweißung<sup>3)</sup>.

Nach Schenck<sup>4)</sup>.

Reagenzien: 2proz. HCl, 5proz. Sublimatlösung. — 50 cm<sup>3</sup> eiweißhaltige Flüssigkeit (z. B. Blut) werden mit 50 cm<sup>3</sup> Wasser vermischt und darauf mit 100 cm<sup>3</sup> 2proz. Salzsäure und 100 cm<sup>3</sup>

<sup>1)</sup> Die Stärkelösung wird so bereitet, daß 1 g lösliche Stärke in einem Probirröhrchen mit etwa 10—15 cm<sup>3</sup> heißem Wasser übergossen wird. Nach Umschütteln erhitzt man vorsichtig über freier Flamme bis alles gelöst ist. Darauf verdünnt man unmittelbar mit gesättigter KCl-Lösung auf 100 cm<sup>3</sup>, schüttelt um und filtriert, wenn nötig. Diese Stärkelösung ist haltbar.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu Prakt. II, S. 173, 180, 417 ff.

<sup>3)</sup> Vgl. Prakt. II, S. 161, 197 ff.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 55, S. 203.

5proz. Sublimatlösung versetzt. Man filtriert am nächsten Tage, leitet  $H_2S$  ein, filtriert wieder und stellt das Volumen fest. Die Entfernung des  $H_2S$  erfolgt mittels Durchleitens von Luft.

Mit Trichloressigsäure.

Reagenzien: 12proz. Trichloressigsäure, Oktylalkohol. In ein Meßkölbchen von  $50\text{ cm}^3$ , worin sich  $25\text{ cm}^3$  Wasser befinden, werden  $7\text{--}8\text{ cm}^3$  Blut (oder eine andere eiweißhaltige Flüssigkeit) unter ständigem Bewegen des Kölbchens gegeben. Man setzt  $1\text{--}2$  Tropfen Oktylalkohol zu und unter leichtem Umschütteln langsam  $12\text{--}13\text{ cm}^3$  Trichloressigsäure. Die Mischung bleibt  $10$  Min. lang stehen. Das ausgeflockte Eiweiß wird dann scharf abzentrifugiert.

Mit Natriumwolframat nach Folin und Wu<sup>1)</sup>.

Reagenzien: 1. 10proz. Natriumwolframat,  $Na_2WO_4$ ,  $2\text{ H}_2O$ . Das käufliche Salz enthält oft zuviel Soda,  $1\text{ g}$  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.

2.  $\frac{2}{3}$ -n-Schwefelsäure,  $18,47\text{ cm}^3$  konzentrierte Säure ( $d = 1,84$ ) auf  $1000\text{ cm}^3$ .

3. 2-n-Schwefelsäure.

Die abgemessene Blutmenge wird in einem Gefäße vom  $15$  bis  $20$ fachen Rauminhalt mit dem  $7$ fachen 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 ( $20\text{ mg}$  sind schon reichlich für  $10\text{ cm}^3$  Blut) oder Zitrat (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,  $10\text{ cm}^3$  verbrauchen  $0,1\text{--}0,2\text{ cm}^3$  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 Blut-

<sup>1)</sup> Folin u. Wu: Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 81. 1919, vgl. Prakt. II, S. 161, 187.

menge. 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.

Enteaweißung nach Rona und Michaelis mittels kolloidalem Eisenhydroxyds.

Im Blutserum<sup>1)</sup>. 5 cm<sup>3</sup> Blutserum werden auf das 12—14 fache mit destilliertem Wasser verdünnt, das Volumen genau notiert und 4 cm<sup>3</sup> Ferrumoxyd. dialysat. (5 proz. Liq. ferri oxydati dial., Merck“, 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 Eisenhydroxydlösung (5 proz.) 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-Eisenhydroxyd ausflockt. Jetzt setzt man ca. 0,1—0,2 g feingepulvertes Magnesiumsulfat oder Kaliumsulfat zu und schüttelt kräftig 1—2 Min. lang. Es wird filtriert, wobei das Filtrat klar und farblos sein soll. Ein sehr langsames Filtrieren deutet auf eine ungenügende Enteaweißung hin. 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 eingengt werden. Die Enteaweißung mit Eisen kann auch mit der Hitzeoagulation kombiniert werden (vgl. S. 184).

Enteaweißung mittels Kaolins nach Michaelis und Rona<sup>2)</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 auf-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 332. 1908; Bd. 14, S. 479. 1908.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 330. 1908.

zuhellen 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.

#### Kolorimetrische Bestimmung des Aminosäurenstickstoffs nach Folin<sup>1)</sup>.

Prinzip: Die Methode beruht auf der Farbreaktion, die Aminosäuren mit  $\beta$ -Naphthochinonsulfosäure in alkalischer Lösung geben.

Darstellung von  $\beta$ -naphthochinonsulfosaurem 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 Eingießens 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. Dauer der ganzen Operation etwa 15 bis 20 Min.

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.

<sup>1)</sup> Folin: Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 377. 1922. Darstellung nach Mandel-Stuedel: Minim.-Methoden d. Blutuntersuchung. S. 31. Berlin-Leipzig 1924.

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- $\beta$ -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 filtriert durch ein Saugfilter von ungefähr 20 cm Durchmesser unter mäßigem Saugen und wäscht mit ungefähr 2 l kalten Wassers nach. 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 Natriumkarbonat 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 unter geringem Saugen 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 strohgelbe 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, umkristallisiert, 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 Kolorimeter 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> Neblers Reagens. Es darf keine gelbe Färbung auftreten.

Ferner sind folgende Lösungen erforderlich.

Natriumkarbonatlösung: 50 cm<sup>3</sup> fast gesättigter Sodalösung werden auf 500 verdünnt. 20 cm<sup>3</sup> 0,1 n-HCl werden mit dieser Sodalösung mit Methylrot als Indikator titriert. Die Sodalösung wird nun so verdünnt, daß 8,5 cm<sup>3</sup> 20 cm<sup>3</sup> 0,1 n-HCl entsprechen.

Essigsäure Azetatlösung: 100 cm<sup>3</sup> 50proz. Essigsäure mit dem gleichen Volumen 5proz. Na-Azetatlösung verdünnt.

Na-Thiosulfatlösung: 4proz. Lösung des kristallisierten Salzes.

Aminosäurevergleichslösung: Eine Lösung von Glykokoll, Leuzin, 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 0,2 proz. Na-Benzoeat 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 Sodalösung 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% Naphthochinonsulfosäurelösung zu jeder Probe; es wird gut umgeschüttelt und bis zum nächsten Tage an einen völlig dunklen Ort gestellt. Am anderen Tage werden zunächst 2 cm<sup>3</sup> Essigsäure-Azetatgemisch und dann 2 cm<sup>3</sup> der Thiosulfatlösung zugegeben. Hierdurch wird der Überschuß an Reagens entfärbt. Nun wird bis zur Marke 25 aufgefüllt, umgeschüttelt und im Kolorimeter 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:

<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. Vgl. Abderhalden und Buadze: Med. Klin. Bd. II, S. 1674. 1928; Fermentforschung Bd. 10, S. 111. 1928. — Abderhalden: Fermentforschung Bd. 9, S. 119, 312. 1928; Bd. 11, S. 1. 1929.



Am einfachsten läßt sich der Abbau nach E. Abderhalden wie folgt zeigen<sup>1)</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 + Plazenta. 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 Teilehen. 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 Überschichtung 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 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. 28 und 34).

---

<sup>1)</sup> Fermentforschung Bd. 5, S. 163. 1921. Med. Klinik, 1921, Nr. 48. Über Anwendung von Harn an Stelle von Serum zum Nachweis der Abderhaldenschen Reaktion vgl. Abderhalden und Buadze: Fermentforschung Bd. 10, S. 455. 1929; Bd. 11, S. 305. 1930. Über die Fermentkomplexe, die der Abderhaldenschen Reaktion zu Grunde liegen vgl. Abderhalden und Buadze. Fermentforschung Bd. 12, S. 465. 1931.

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 0,86 proz. NaCl-Lösung gefüllt, 1 Std. stehen gelassen. Zusatz eines Kriställchens Thymol stört die Bestimmung nicht. Die Kochsalzlösung wird dann möglichst vollständig abgesaugt. Nun läßt man 3—4 Tropfen Serum aus einer frisch ausgezogenen Kapillare 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 Glaskapillare 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.

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 stammen, vollkommen hämoglobinfrei, nicht chylös, 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 ent-

<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.

sprechend 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 Röhren 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. 34.)

### 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 wirksame 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.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 163. 1908.

Die Beziehungen zwischen der Spezifität des Trypsins und des Papains und der Einfluß der spezifischen Aktivatoren auf diese werden 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 und Graßmann<sup>2)</sup>]. Nach früheren Angaben von C. Delezenne, H. Mouton 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<sup>3)</sup>.

Darstellung: Benutzt wird das Mercksche Präparat. Durch Behandlung mit Blausäure bei 40° werden zuerst die begleitenden Eiweißkörper abgebaut. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß man z. B. 10 cm<sup>3</sup> 3 proz. Kaliumzyanidlösung mit HCl auf Methylrot neutralisiert, mit 225 mg Papain und 25 cm<sup>3</sup> 1/5-m-Dinatriumzitat 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 dienen 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 Enzym-

<sup>1)</sup> Waldschmidt-Leitz und Harteneck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 149, S. 212. 1925.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 138, S. 184. 1924.

<sup>3)</sup> Vgl. auch Krebs: Biochem. Zeitschr. Bd. 220, S. 288. 1930.

lösung durch Luftstrom oder Dialyse oder am besten durch Eindampfen der Lösung im Vakuum auf etwa  $\frac{1}{3}$  hinterläßt das Enzym in nichtaktiviertem, wieder aktivierbarem Zustand.

Zur Darstellung konzentrierter Papainlösungen empfehlen Kraut und Bauer<sup>1)</sup> den trockenen Succus Caricae Papayae (Merck) vorher mit Chloroform (50 ccm auf 10 g) bei Zimmertemperatur zu extrahieren, wobei ohne Fermentverlust harzige Beimengungen entfernt werden. Man saugt das Chloroform ab und trocknet im Vakuum. 10 g des so vorbehandelten fein verriebenen Pulvers werden mit Wasser von 40° gleichmäßig angefeuchtet, dann mit 25 ccm Wasser und 1 g Kieselgur vermischt, und durch ein Rapidfilter abgesaugt. Geringe Trübungen setzen sich über Nacht zu Boden und können dann durch Dekantieren und Filtration entfernt werden.

Reinigung durch Alkoholfällung<sup>2)</sup>. 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. 5) 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-Zitratpuffer und Toluol ver-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 164, S. 10. 1926/27. Vgl. hier auch die Reinigung des Papains durch Bleiphosphatfällung.

<sup>2)</sup> Vgl. Willstätter und Graßmann: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 138, S. 184. 1924.

setzt ist, im 50-cm<sup>3</sup>-Meßkolben mit 30 cm<sup>3</sup> 6,6proz. 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 Indikator dient Thymolphthalein (das mit Zitrat scharf, mit Phosphatpuffer unscharf umschlägt). Die Ausführung der Titration siehe S. 305 ff.

Beispiele: I. Hydrolyse ohne und mit Blausäure. 3,6 g Gelatine mit 8 cm<sup>3</sup> Azetatpuffer (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	—
0,2 g 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. Zitratpuffer ( $p_h = 5,0$ ); 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 Charakteristikum die Spaltung der Bindungen zwischen Stickstoff und Kohlenstoff ist<sup>1)</sup>.

Über Purinamidasen vgl. S. 364.

## 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 im 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 Petroläther 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. Man erhält einen hornartigen Rückstand, der mit dem Spatel abgekratzt und im Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben wird<sup>3)</sup>. 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 Folinische Methode (vgl. S. 336), die unten in der Modifikation von Lövgren 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

<sup>1)</sup> Vgl. Oppenheimer: „Die Fermente“, S. 777.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 69, S. 116. 1914.

<sup>3)</sup> Über Darstellung der Urease nach van Slyke und Cullen vgl. Prakt. Bd. 2, S. 500. Über die Darstellung von kristallisierter Urease vgl. Sumner: J. amer. chem. Soc. Bd. 5, S. 1255. 1929; J. of Biol. Chem. Bd. 69, S. 2, 435. 1926; Bd. 76, S. 149. 1928; Bd. 70, S. 1, 97. 1926. Über Schwermetallinaktivierung hochgereinigter Urease vgl. Sumner und Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 189, S. 218. 1930.

vorgenommen werden oder man muß mit sehr verdünnten Harnstofflösungen arbeiten<sup>1)</sup>.

Prinzip: Das Ammoniak wird durch Alkalikarbonat freigemacht und durch einen, mittels  $H_2SO_4$  ammoniakfrei gewaschenen Luftstrom in die Säurevorlage übergeführt.

Ausführung: Der Reaktionskolben bleibt während des ganzen Versuches mit der Säurevorlage einerseits und mit der Waschflasche mit  $H_2SO_4$  andererseits luftdicht verbunden (Abb. 100). 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 Pottasche-

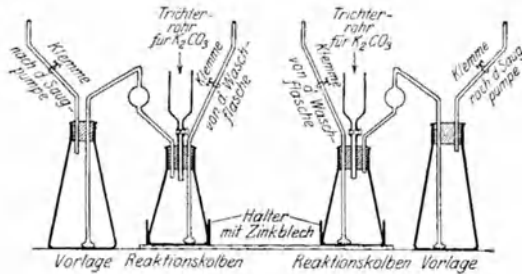


Abb. 100.

lösung gegossen werden. Nach der beabsichtigten Spaltungszeit wird der Hahn geöffnet und, nachdem die Pottaschelösung in die Reaktionsmasse geflossen ist, rasch wieder zugezogen. Die  $K_2CO_3$ -Lösung bricht die Fermentreaktion momentan ab. Eine Viertelstunde später wird der Luftstrom zu seiner vollen Stärke angeschlossen. Die Zeit der nötigen Durchlüftung ist abhängig von 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  $n/10$ -NaOH mit Methylrot als Indikator 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.

<sup>1)</sup> Vgl. Lövgren: Biochem. Zeitschr. Bd. 119, S. 215. 1921; Bd. 137, S. 206. 1923.



Eine Versuchsanordnung sei nach Euler und Brunius wiedergegeben<sup>1)</sup>: 0,5 g des Ureasepräparates werden in 25 cm Wasser gelöst. Die Reaktionsmischung besteht aus: 20 cm<sup>3</sup> 1 mol Harnstofflösung + 50 cm<sup>3</sup> 1 mol Phosphatmischung von  $p_n$  7,30 + 10 cm<sup>3</sup> Fermentlösung + 20 cm<sup>3</sup> Wasser. Gesamtvolumen 100 cm<sup>3</sup>, Harnstoffkonzentration 0,2 mol. — Für die Ammoniakbestimmungen werden je 10 cm<sup>3</sup> entnommen; mit 10 cm<sup>3</sup> 0,5 n und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird die Fermentwirkung unterbrochen.

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

Das Histozym spaltet außer Hippursäure Azetylglyzin,  $\alpha$ -Benzoylalanin, l-Benzoylleuzin, d- $\alpha$ -Benzoylaminobuttersäure, ferner Glykochol- und Taurocholsäure; es spaltet nicht  $\beta$ -Benzoylalanin,  $\beta$ -Benzoylaminobuttersäure, Benzoylaminoisobuttersäure, l- $\alpha$ -Benzoylaminobuttersäure (Smorodinzew).

Darstellung nach Smorodinzew<sup>3)</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

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 183, S. 1. 1927. — Im Verlauf der Ureasewirkung kann die Wasserstoffionenkonzentration nicht mit Wasserstoffelektroden bestimmt werden, da Gegenwart von Ammoniak die Bestimmung stört. Die Chinhydronmethode (vgl. S. 90) soll jedoch geeignet sein.

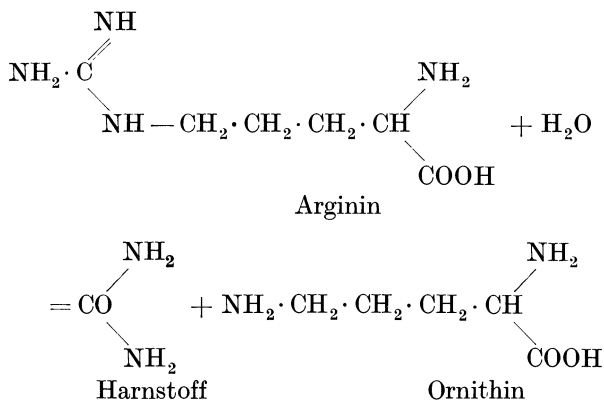
<sup>2)</sup> Neuberg u. Rosenthal: Biochem. Zeitschr. Bd. 145, S. 186. 1923. Neuberg u. Linhardt: Ebenda Bd. 147, S. 372. 1924.

<sup>3)</sup> Smorodinzew: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 124, S. 123. 1923. Vgl. auch Neuberg und Noguchi: Biochem. Zeitschr. Bd. 147, S. 370. (Spaltung von Phenazetursäure.)

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 Auszüge 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 Petroläther wird aus dem Kolben mit einem trockenen Luftstrom vertrieben. Der Kolben bleibt über Nacht im Exsikkator. Die Benzoesäure bleibt in Form nadelförmiger Kristalle (Schmelzpunkt 121 bis 122°) zurück und kommt so zur Wägung.

### Arginase<sup>1)</sup>.

Das Ferment katalysiert den Zerfall von Arginin in Ornithin und Harnstoff nach der Gleichung



Guanidinessigsäure und Guanidinpropionsäure werden nicht gespalten. Aus d-l-Arginin spaltet das Ferment l-Arginin ab<sup>2)</sup>, nur die d-Form wird abgebaut. Nach Edlbacher<sup>3)</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

<sup>1)</sup> Kossel u. Dakin: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 41, S. 321. 904; Bd. 42, S. 181. 1904.

<sup>2)</sup> Riesser: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 49, S. 210. 1906.

<sup>3)</sup> Edlbacher: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 100, S. 111. 1917.

reiche Mengen Arginase, die von weiblichen meistens keine. Hoden von Hähnen, Taubern, Stier, Hund und Meerschweinchen enthalten reichlich Arginase, Kälberhoden hingegen nur wenig<sup>1)</sup>. Auch in Pilzen und in höheren Pflanzen findet sie sich [Kiesel<sup>2)</sup>]. Hefe sowohl als auch Sojabohnen enthalten keine Arginase [Edlbacher<sup>3)</sup>].

Darstellung<sup>4)</sup>. Zur Untersuchung dient meistens Leberpreßsaft [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 feinerhackte 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 Azeton eingegossen wird. Man vermeide, das Präparat länger als irgend nötig mit dem Aze-

<sup>1)</sup> Edlbacher, S. u. Bonen: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 145, S. 69. 1925.

<sup>2)</sup> Kiesel: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 75, S. 169. 1911; Bd. 118, S. 267. 1921.

<sup>3)</sup> Vgl. Edlbacher: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 100, S. 115. 1917.

<sup>4)</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.  $H_2SO_4$  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 Kristallmasse ab, wäscht mit kaltem Wasser nach und bringt den Filtrerrückstand 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 Stehen in der Kälte ausgeschiedene flaviansaure Arginin wird abgentscht, wie oben gewaschen und dann wie folgt in das Karbonat 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 Kristallisation des Karbonats stark eingengt. — 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 Karbonat gewonnen. Vgl. auch Pratt, Ö. E.: Journ. Biol. Chem. Bd. 67, S. 351. 1926.

ton in Berührung zu lassen. Der gebildete Niederschlag wird dann auf der Nutsche abgesaugt, mit Azeton, Alkohol und Äther nachgewaschen und im Exsikkator 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 dem doppelten Gewicht Quarzsand in der Reibschale fein verrieben wurde; mit  $50\text{ cm}^3$  Wasser wurde dann eine Suspension hergestellt, die nach 5 Min. langem Stehen von den gröberen Partikeln abgessogen wurde. Besser ist es, das verriebene Organ 24 Std. lang mit der vierfachen Menge Glycerin zu extrahieren. Dann kühlt man durch eine mehrfache Lage Mull. Kühl und im Dunkeln aufbewahrt sind solche Extrakte wochenlang haltbar. Edlbacher und Simons<sup>1)</sup> verfahren wie folgt: Der Leberpreßsaft wird unter starkem Rühren in die zehnfache Menge Azeton eingetropft, dreimal mit Azeton dekantiert, sofort energisch abgesaugt, und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. (Der Schwefelsäure wird Kaliumbichromat zugesetzt, um eine Reduktion der Schwefelsäure zu schwefliger Säure zu vermeiden.) Es muß vermieden werden, das Ferment länger als nötig mit dem Lösungsmittel in Berührung zu lassen. Zur Bereitung einer Fermentlösung verreibt man dann z. B. 1 g-Fermentpulver mit  $100\text{ cm}^3$  Wasser, läßt unter Toluol 12 Std. bei  $38^\circ$  stehen und filtriert.

Die Reinigung des Fermentes erfolgte nach folgendem Prinzip: Dreimalige Voradsorption von Glycerinleberextrakt mit Tonerde von der Sorte C<sub>7</sub>, dann Hauptadsorption mit Kaolin, dann Elution des Fermentes von dem Adsorbat mittels Glykokoll-Natronlauge-Kochsalz vom  $p_h$  9 und Fällung des Eluates durch Azeton.

Nachweis:

Zum Nachweis kann man die Formoltitration (siehe S. 289) des gebildeten Ornithins benutzen. Im Arginin ist nur das  $\alpha$ -N-Atom formoltitrierbar, Harnstoff reagiert nicht, und da Ornithin mit beiden Amidgruppen reagiert, so muß also der doppelte Wert des Formolstickstoffes nach der vollendeten Hydrolyse des Arginins erscheinen.

Beispiel<sup>2)</sup>:

Organ: Kalbslebersuspension. 5 g der ganz frischen Organe wurden zerkleinert, mit Quarzsand verrieben,  $25\text{ cm}^3$  destilliertes Wasser zuge-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 167, S. 76. 1927.

<sup>2)</sup> Edlbacher: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 95, S. 81. 1915.

setzt, umgeschüttelt und ca. 10 Min. im Reagensglas gelassen. Die über dem Bodensatz schwebende feine Suspension wurde abgessogen, 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	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	verbrauchte $\frac{1}{5}$ n-NaOH
3,9 cm <sup>3</sup>	0,6 cm
— 0,6 „	

Differenz 3,3 cm<sup>3</sup> = 9,24 mg Formol-N.

In Prozenten gefunden 185,9% (Arginin-N = 100%),  
berechnet 200,0%.

Nach 14 stündigem Digerieren 196%. Eine noch weite Spaltung gelang nicht.

Neuerdings verwenden Edlbacher und P. Bonen<sup>1)</sup> die Urease-Methode zum Nachweis des gebildeten Harnstoffs. Diese Methode ist der obigen überlegen. Folgendes Beispiel schildert das Verfahren. Je 50 cm<sup>3</sup> einer etwa 2 proz. Argininkarbonatlösung 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 12 stündigem 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<sup>2)</sup> (vgl. S. 349)

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 145, S. 71. 1925.

<sup>2)</sup> Ein Ansatz mit geringeren Mengen: 5 cm<sup>3</sup> eines Glycerin-Organextraktes, 5 cm<sup>3</sup> 1 proz. Argininkarbonatlösung, 10 cm<sup>3</sup> Glykokoll-NaOH-NaCl-Puffer von  $p_h$  9,5. — Zur Bestimmung des präformierten Harnstoffs derselbe Ansatz nur statt der Argininlösung 5 cm<sup>3</sup> Wasser. — Vgl. auch Hunter und Dauphinee: Die Arginase-Methode zur Bestimmung des Arginins. J. of biol. Chem. Bd. 85, S. 627. 1930.

Berechnung: Von den vier N-Atomen des Arginins werden durch das Ferment zwei in Harnstoff übergeführt, die als Ammoniak gemessen werden.  $1 \text{ cm}^3 \frac{1}{50} \text{ n-Säure} = 0,28 \text{ mg N}$ . Enthalten z. B.  $5 \text{ cm}^3$  der Arginaselösung  $14 \text{ mg N}$ , so erscheinen bei vollkommener Spaltung  $7 \text{ mg N}$  als  $\text{NH}_3$ .

Als Arginaseeinheit (A.E.) wird diejenige Menge Arginase bezeichnet, die aus  $10 \text{ cm}^3$  einer 1 proz. Argininkarbonatlösung, die mit  $5 \text{ cm}^3$  Glykokoll-NaOH-NaCl auf  $p_h 9,5$  gepuffert ist, bei  $38^\circ$  in 60 Min. so viel Harnstoff bildet, daß bei der Zerlegung durch Urease  $0,34 \text{ mg NH}_3$  ( $= 1 \text{ cm}^3 0,02 \text{ n-H}_2\text{SO}_4$ ) geliefert werden. Die Genauigkeit der Bestimmung schwankt um  $\pm 1 \text{ A.E.}$ , bei höheren Werten um  $\pm 3-4 \text{ A.E.}$  — Die genauesten Werte werden zwischen  $4-30 \text{ A.E.}$  erhalten<sup>1)</sup>.

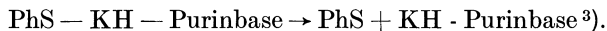
### Nukleasen.

Die Nukleinsäuren, die im Organismus in salzartiger Bindung an Eiweißkörper vorkommen, werden von einer Reihe mehr oder weniger gut bekannter Fermente katalytisch zerlegt. Die Loslösung der Eiweißkomponente wird den bekannten Eiweißfermenten des Verdauungstraktus zugeschrieben. Die Nukleinsäuren sind Phosphorsäureester mit Kohlehydraten der 5- oder 6-C-Reihe, die ihrerseits Purin bzw. Pyrimidinkörper glukosidartig gebunden haben<sup>2)</sup>.

Der fermentative Abbau vollzieht sich in mehreren Stufen:

1. Das Polynukleotid wird von Fermenten (Polynukleotidasen oder Nukleinasen) in einfache Nukleotide gespalten, indem die Zwischenverbindungen gelöst werden.

2. Die Nukleotide werden von Phosphatasen gespalten (Nukleotidasen) nach folgendem Schema:



3. Die Puringlukoside werden von Glukosidasen (Nukleosidasen) in ihre beiden Komponenten zerlegt. Bisher sind nur Fermente bekannt, die die Glukoside mit Adenin und Guanin als Paarlinge spalten<sup>4)</sup>.

4. Diese Aminopurine werden desaminiert, aus Adenin entsteht dabei Hypoxanthin, aus Guanin Xanthin (Purinamidasen).

<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.

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>1)</sup>.

Weiterhin wird durch eine Xanthinoxidase 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 „Nuklease“ bezeichnete Ferment ein Gemenge von verschiedenen Teilfermenten ist und daß die bei dem Verfolgen der Wirkung der „Nuklease“ benutzten Verfahren entweder nur Teilvorgänge oder Endprodukte eines komplizierten Reaktionsablaufes erfaßt haben.

Trotzdem sollen hier einige ältere Arbeitsweisen, die sich mit der Spaltung des Nukleinsäuremoleküls befassen, Erwähnung finden.

Aus tierischen Organen erhält man nukleasehaltige 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>2)</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 Nuklease.

Zum Nachweis der Spaltung versetzte Sachs 50 cm<sup>3</sup> Pankreasextrakt mit 50 cm<sup>3</sup> einer 4proz. Lösung des  $\alpha$ -nukleinsäuren 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 Nukleinsäure 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>3)</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

<sup>1)</sup> Vgl. Thannhauser u. Ottenstein: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 114, S. 17. 1921.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 46, S. 337 (348). 1905.

<sup>3)</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.

Luft von  $H_2S$  und fällt mit ammoniakalischer Silberlösung<sup>1)</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  $H_2S$  geleitet und dann wieder filtriert. Das letzte Filtrat wird zur Abscheidung der Kristalle von salzsauren Purinbasen eingedampft. Die Kristalle wurden mit Alkohol und Äther getrocknet und gewogen.

Tschernoruzki<sup>2)</sup> bestimmt den bei der Spaltung freigesetzten anorganischen Phosphor.

Pighini<sup>3)</sup> hat eine optische Methode vorgeschlagen. Die von ihm verwandte Nukleinsäurelösung wurde so bereit, daß 1,60 g Nukleinsäure 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 als auch die Drehungsänderung bei 37°. — Löst man 2,0 g Nukleinsäure (Boehringer) in 80 cm<sup>3</sup> Wasser unter Zusatz von so viel  $KOH$  oder  $NH_3$ , 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 3,0 proz. Traubenzuckerlösung. Besonders bequem ist die Anwendung des Boehringerschen nukleinsäuren Natriums, das sich völlig klar in Wasser löst (2 proz. Lösung dreht wie eine 2,9 proz. Traubenzuckerlösung<sup>4)</sup>).

#### Darstellung von Nukleosidase (Ribonukleosidase) nach P. A. Levene<sup>5)</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 Lö-

<sup>1)</sup> Man löst 26 g Silbernitrat in überschüssigem  $NH_3$  und füllt mit destilliertem Wasser auf 1 l auf.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 352. 1912.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 70, S. 85. 1910.

<sup>4)</sup> Neuberg, C.: Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 505. 1911.

<sup>5)</sup> Levene, P. A., M. Yamagawa u. J. Weber: Journ. of biol. chem. Bd. 60, S. 693ff. 1924. — Levene u. Weber: Ebenda S. 707. Über Thy-monuklease vgl. Kikkōji: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 51, S. 201. 1907.



sung 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  $p_h = 8,76$  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 (auf etwa  $\frac{1}{5}$  des Anfangsvolumens) konzentriert.

Aus dieser Lösung kann das Enzym durch einen großen Überschuß trockenen Azetons gefällt werden. Das Präzipitat wird schnell an der Saugpumpe filtriert und unter vermindertem Druck über Schwefelsäure oder Kalziumchlorid getrocknet. Dieses Präparat behält praktisch über 10 Monate die ganze Aktivität. 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 Azeton und trockenem Äther gewaschen und im Vakuum 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.

Zur Darstellung der Ribopolynukleotidase<sup>1)</sup> aus gekochtem Pankreassaft ließ Jones ein Gemisch von 2 kg sorgfältig

<sup>1)</sup> Amer. J. Phys. Bd. 52, S. 203. 1920. Über Darstellung der Ribonukleotidase vgl. Levene und Medigreceanu: J. Biol. Chem. Bd. 9, S. 65. 1911.

präpariertem und gemahlenem Schweinepankreas, 2 l Wasser und 30,0 cm<sup>3</sup> Chloroform 12 Std. bei Zimmertemperatur unter häufigem Schütteln digerieren; dann wurde das Gemisch in einen Thermostaten von 40° gestellt und 2 Tage dort belassen. Nach dem Abkühlen wurde filtriert. Das klare Filtrat wurde dann gekocht, von einer geringen Menge Koagulat abfiltriert und mit Chloroform konserviert.

Um einen auf Nukleoside 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 cm<sup>3</sup>) wird mit 1,5 g Nukleosid (Adenosin, Guanosin oder Xanthosin), das in 300 bis 500 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst wurde, versetzt; dann leitet man (unter Zusatz von 20 cm<sup>3</sup> Chloroform und einigen Tropfen Oktylalkohol) bei 39° 3 Std. Luft durch. Man enteiweißt durch Aufkochen bei schwach essigsaurer Reaktion und gibt noch zur vollständigen Enteiweißung nach dem Erkalten 1,5proz. kaltgesättigte Uranylazetat-lösung (zu 920 cm<sup>3</sup> Filtrat 370 cm<sup>3</sup>) hinzu. Nach 12stündigem Stehen wird vom Uranylazetatniederschlag abfiltriert, das Filtrat im Vakuum auf ca. 800 cm<sup>3</sup> eingengt und die Flüssigkeit zur Isolierung der Nukleoside und Purine nach Krüger-Schmidt gefällt<sup>2)</sup>. Zu diesem Zweck wird die Flüssigkeit mit 200 g Natriumazetat und 480 g Natriumbisulfid-lösung versetzt, aufgekocht, 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 cm<sup>3</sup> Wasser) in der Hitze durch H<sub>2</sub>S zerlegt und heiß filtriert.

Die Trennung der freien Purine und der Nukleoside in dem Filtrat geschah durch Fällung der kochenden Flüssigkeit mit heißem bas. Bleiazetat und darauf folgender Fällung des Filtrats mit bas. Bleiazetat und Ammoniak. Die freien Purine sollen sich hierbei im ersten, die Nukleoside 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 eingengt, 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> eingengt (eventuell ausgefallenes Xanthin oder Harnsäure abfiltriert), aufgekocht, mit heißer Bleiessiglösung so lange versetzt, bis kein

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 114, S. 20. 1921.

<sup>2)</sup> Vgl. Prakt. II, S. 538.

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 cm<sup>3</sup> 25proz. Ammoniak versetzt. Der nunmehr ausfallende Niederschlag soll die Nukleoside 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 Kristallisation gebracht.

Der zweite (die Nukleoside enthaltende) Niederschlag wird in Wasser suspendiert, mit H<sub>2</sub>S versetzt, das Filtrat im Vakuum eingengt und im Exsikkator über H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nahezu vollständig eingedunstet. Hierbei kristallisieren die Nukleoside aus. Das Kristallat wird in einigen Kubikzentimetern heißen Wassers gelöst, vom Ungelösten (freie Purine) abfiltriert. Aus der Lösung kristallisieren die Nukleoside aus.

Bei der Untersuchung auf Nukleosidase benutzen von Euler und Brunius<sup>1)</sup> als Substrat Adenosin. Die Darstellung des Nukleosids erfolgte nach den Vorschriften von Levene aus Hefe-Nukleinsäure. 100 g Hefe-Nukleinsäure (Firma Boeringer & Söhne) wurden in Ammoniakwasser (80 cm<sup>3</sup> konz. Ammoniak auf 420 cm<sup>3</sup> Wasser) gelöst. Die Lösung wurde im Autoklaven während 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std., bei 135° hydrolysiert. Beim Abkühlen fiel Guanosin aus. Nach dem Stehen der Lösung im Eisschrank über Nacht wurde vom Guanosin abfiltriert, das Filtrat von Guanosin auf dem Wasserbade bis zur Sirupdicke eingedampft, wobei ein Luftstrom über die Oberfläche der Lösung strich. Die Temperatur überstieg dabei nicht 50°. Die dickflüssige Masse wurde mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion versetzt und dann mit 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> l 95proz. Alkohol behandelt. Das Filtrat von der starken Fällung wurde wie vorhin eingedunstet, mit Schwefelsäure schwach angesäuert. Hierauf wurde eine gesättigte Pikrinsäurelösung im Überschuß zugesetzt, worauf ein gelbbrauner amorpher Niederschlag ausfiel. Die dunkelrote Lösung

<sup>1)</sup> von Euler und Brunius: Arkiv för Kemi Bd. 9, S. 14. 1927.

dieses Niederschlages im heißen Wasser wurde mit Tierkohle gekocht. Nach dem Erkalten fiel Adenosin-Pikrat aus, das nach zweimaligem Umkristallisieren in einheitlichen Kristallen erhalten wurde. Diese wurden in einer größeren Menge Wasser aufgelöst, nach dem Abkühlen mit Schwefelsäure versetzt, worauf die freie Pikrinsäure mit Äther ausgeschüttelt wurde. Die Lösung wurde mit Bariumkarbonat neutralisiert und auf ein kleines Volumen eingengt. Das Einengen wurde im Vakuumexsikator über konz. Schwefelsäure fortgesetzt. Das so erhaltene Adenosin wurde zweimal aus heißem Wasser umkristallisiert. Schmelzp. 228°. Aus 100 g Hefe-Nukleinsäure wurden 3 g reines Adenosin erhalten.

Bei dem fermentativen Spaltungsversuch war der Ansatz: 50 mg Adenosin + 5 cm<sup>3</sup> 1/3-Mol-Phosphatmischung ( $p_h$  7,5) +  $x$  cm<sup>3</sup> Fermentlösung + 20 —  $x$  cm<sup>3</sup> Wasser. Eine Probe ohne Adenosin ist stets auszuführen. Zur Bereitung des Fermentmaterials diente Schweineniere. 2 kg Schweineniere wurden fein vermahlen, mit 3,5 Liter Wasser versetzt. Nach Zusatz von Toluol wurden die Nieren bei 40° 24 Stunden autolytisiert, dann durch ein Sieb getrieben. Nach weiteren 24 Stunden Autolyse wurden die ausgeschiedenen Eiweißmengen abzentrifugiert und eine klare Fermentlösung gewonnen, deren Aktivität nach der Formel

$$\frac{k}{g}$$

wo  $g$  das Trockengewicht der Fermentlösung, die in Kubikzentimeter der Reaktionsmischung vorhanden ist,  $k$  die Reaktionskonstante erster Ordnung bedeutet.

Der Reaktionsmischung wurden von Zeit zu Zeit Proben entnommen. Um die Fermentreaktion abzubrechen und die für die nachfolgende Zuckerbestimmung störenden Stoffe zu entfernen, wurde der Probe eine Quecksilber-Azetatlösung (70 g Quecksilber-Azetat und 5 cm<sup>3</sup> Eisessig pro Liter) zugesetzt, und zwar zu je 5 cm<sup>3</sup> Probe 5 cm<sup>3</sup> Azetatlösung. Die Mischung bleibt für 2 Stunden im Eisschrank; man zentrifugiert dann die klare Lösung ab. Bevor die Ribose bestimmt wird, fällt man das Quecksilber aus der Lösung mit Schwefelwasserstoff, das Filtrat von Quecksilbersulfid wird mittels eines durchzusaugenden Luftstromes vom Schwefelwasserstoff befreit, und die freie Essigsäure mit festem wasserfreiem Natriumkarbonat neutralisiert. In 5 cm<sup>3</sup> der neutralisierten Probe wurde die durch die Fermentwirkung freigemachte Ribose nach der jodometrischen Zuckerbestimmung von Shaffer-Hartmann<sup>1)</sup> bestimmt, wobei die erhaltenen Kupferwerte als Glu-

1) Journ. of biol. chem. Bd. 45, S. 378. 1920; Ber. d. ges. Phys. Bd. 7, S. 9. 1921.

kose berechnet wurden, da für Ribose keine Reduktionstabelle vorlag.

Das Ferment wird bei einer Azeton-Konzentration von 50% quantitativ gefällt.

Die Bestimmung der Hepato-Nukleotidase (vom Rind) erfolgt nach W. Deutsch<sup>1)</sup> wie folgt: In 20 cm<sup>3</sup> einer 4 proz. Lösung von thymusnukleinsaurem Natrium (hergestellt nach Feulgen), die ebenso wie die benutzte Fermentlösung durch 20 proz. NaOH auf  $p_h$  8,7 (auf das Optimum des Fermentes) eingestellt ist, werden 10,0 cm<sup>3</sup> 1 n-Ammoniak-Ammonchloridpuffer (1:1; bei 40°  $p_h$  8,7 ergebend) und die zu bestimmende Fermentlösung gegeben und mit Wasser bzw. Glycerin zu einem Gesamtvolumen von 40,0 cm<sup>3</sup> und zu einem Glyzeringehalt von 17% ergänzt. Der Ansatz verbleibt nach geringem Toluolzusatz für eine Stunde im Thermostaten bei 40°. Nach Ablauf der Einwirkungszeit werden nach gutem Durchschütteln 10,0 cm<sup>3</sup> entnommen und zu 10,0 cm<sup>3</sup> 10 proz. Trichloressigsäure zur Enteiweißung gegeben, wobei weitere Fermentwirkung gleichzeitig unterbrochen wird. Nach 5 Min. langem Stehen wird der Niederschlag abfiltriert, vom Filtrat 10,0 cm<sup>3</sup> entnommen und die freie anorganische Phosphorsäure nach Alkalisierung mit 2 proz. Ammoniak durch Magnesiämischung gefällt. Der nach wenigstens 5 stündigem Stehen abfiltrierte Niederschlag wurde dann in Salpetersäure gelöst und als Ammoniumphosphormolybdat nach Lieb (vgl. S. 146) bestimmt. Zu jeder Bestimmung wird eine Analyse des Substratenwertes und der Fermenteigenspaltung ausgeführt.

Als Einheit der Hepato-Nukleotidase bezeichnet Deutsch diejenige Fermentmenge, die unter den mitgeteilten Bedingungen bei der Einwirkung auf 0,8 g thymusnukleinsaurem Natrium in einer Stunde einen Zuwachs an freiem anorganischen Phosphor entsprechend 6,25 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$  n-NaOH bewirkt. Eine Einheit ist in etwa 10,0 cm<sup>3</sup> des Rohglyzerinauszuges enthalten. Als Maß für die Fermentkonzentration gilt die Anzahl Einheiten in 1 g getrocknetem Präparat.

Zur Gewinnung der Fermentlösung wurde frisch vom Schlachthof bezogene Rinderleber fein zermahlen, der Organbrei mit 0,15% NH<sub>3</sub> enthaltendem Glycerin (87 proz.) auf der Schüttelmaschine 15 Min. geschüttelt (für 1 g Leberbrei 2 cm<sup>3</sup> Glycerin), 4—5 Stunden bei 40° digeriert, dann durch Faltenfilter filtriert.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 171, S. 264. 1927. Vgl. auch Bd. 186, S. 11. 1929. (Die während der Spaltung entstehende hemmend wirkende freie Phosphorsäure wird hier durch hinzugefügte Magnesiumionen als Bodenkörper abgefangen.)

Eine Azeton-Äther-Vorbehandlung der Leber vernichtet das Ferment. — Durch Ansäuern der Glycerinauszüge mit Essigsäure erhält man bei  $p_h$  4,7 eine Eiweißfraktion, die den gesamten Fermentgehalt des Glycerinauszuges enthält. Durch Lösen der Fällung mit verdünnter NaOH bis  $p_h$  8,7 ist eine Steigerung des Reinheitsgrades der Nukleotidase auf das dreifache zu erreichen.

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 kolliert, 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>. Der Nachweis der Fermentwirkung erfolgt durch den Nachweis der Umwandlung von Guanin in Xanthin und Adenin in Hypoxanthin. Das Hypoxanthin wird als Pikrat isoliert, das Xanthin als Silbersalz, das in das Chlorhydrat übergeführt werden kann<sup>4)</sup>.

Xanthinoxidase (Xanthindehydrase)<sup>5)</sup>. Der Nachweis erfolgt durch Umwandlung von Hypoxanthin in Xanthin und von Xanthin in Harnsäure. 500 g Rindermilzextrakt werden mit 0,5 g in wenig n-NaOH gelöster Purinbase (Adenin, Guanin, Xanthin, Hypoxanthin) und etwas Chloroform und Toluol versetzt. Die Mischung wird auf 37° gebracht, und dann Luft in kräftigem Strom durchgeleitet. Nach wenigen Stunden ist der Versuch beendet; die zugegebene Purinbase ist quantitativ als Harnsäure wiederzufinden (vgl. S. 365).

1) Schittenhelm: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 42, S. 254. 1904.

2) Ebenda Bd. 43, S. 228. 1904.

3) Über Adenase und Guanase vgl. Jones u. 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.

4) Vgl. Krüger und Salomon: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 24, S. 364. 1898; Bd. 26, S. 350. 1899.

5) Schittenhelm: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 57, S. 21. 1908.

Bei dem Nachweis von Harnsäure in den Gewebsauszügen haben Steudel und Suzuki<sup>1)</sup> diese mit wolframsaurem Natrium nach Folin enteivweißt (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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt). Zu 5 l Filtrat wurden 4 l Folinischer Silberlaktatlösung<sup>2)</sup> zugefügt, der Ag-Niederschlag wurde abfiltriert, gewaschen und mit HCl zersetzt. Die Untersuchung ergab, daß auch, wenn man die Enteivweißung 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.) Ebensowenig ist nach Steudel die Murexidprobe für Harnsäure beweisend, denn eine ganze Reihe anderer 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 Nukleinbasen Guanin und Adenin, besonders bei Durchlüftung der Extrakte in Xanthin, Hypoxanthin, endlich in Harnsäure übergeführt<sup>3)</sup>).

Zur Bestimmung der Harnsäure in Organen verfahren His und Hagen<sup>4)</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, wie der zugesetzten H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entspricht. Man filtriert, fügt zu dem Filtrat Lithiumkarbonat 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 Lithiumkarbonat 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.

1) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 119, S. 169. 1922.

2) 100 g Silberlaktat werden in 700 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Ferner werden zu 100 cm<sup>3</sup> 85proz. Milchsäure 100 cm<sup>3</sup> 10proz. NaOH gegeben, diese Lösung zu der Silberlaktatlösung gefügt und auf 1 l aufgefüllt.

3) Vgl. Landmann, G.: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 92, S. 416. 1914.

4) Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 30, S. 350. 1900.

Zur Herstellung von wässrigen Extrakten aus Rinderleber, die auf Xanthin gut wirkende Oxydase enthalten, vgl. Burian<sup>1)</sup>.

Zur Darstellung von urikolytischen Fermentlösungen (Urikase, Harnsäureoxydase) empfiehlt Schittenhelm (nach Rosell)<sup>2)</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 Natriumkarbonat und Natriumphosphat, so daß die Lösung stets alkalisch bleibt, so viel, bis sich grobe Flocken bilden. Man filtriert, verreibt den Filtrückstand 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.

Battelli und Stern<sup>3)</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—3mal 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 wässrigem Auszuge aufbewahren. Zur Messung der Urikasewirkung bestimmen Battelli und Stern die Menge der bei der Harnsäureoxydation entstandenen Kohlensäure.

Der Nachweis erfolgt durch Konstatierung des Schwundes der Harnsäure. Man kann dabei folgenderweise verfahren. 350 cm<sup>3</sup>

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 43, S. 497. 1904/05.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 45, S. 161. 1905. Über Urikase vgl. auch Przylecki: C. r. Soc. de Biol. Bd. 98, S. 787. 1928; Acta Biol. exp. Bd. 3, S. 1. 1929.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 19, S. 219 (233). 1909.



Rindernierenextrakt werden mit 0,3 g in möglichst wenig n-NaOH gelöster Harnsäure versetzt. Dann wird etwas Toluol und Chloroform zugegeben, gut gemischt und das Gemisch bei 37° unter ständiger Luftdurchleitung gehalten oder man schüttelt in der Schüttelmaschine. Nach 4—7 Stunden ist alle Harnsäure verschwunden<sup>1)</sup>.

Zur Darstellung des bei dem Abbau der Harnsäure entstehenden Allantoins entfernt man nach Wiechowski<sup>2)</sup> aus dem Filtrat der Silberfällung (vgl. S. 365) das überschüssige Silber durch H<sub>2</sub>S, 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 Bleikarbonat, versetzt mit Bleiazetat; das Filtrat von der Bleifällung wird mit H<sub>2</sub>S behandelt, ferner bei Anwesenheit von Chlor die essigsäure Lösung mit Silberazetat versetzt und mit H<sub>2</sub>S behandelt. Zu dem mit chlorfreier NaOH genau neutralisierten Filtrat setzt man von einer 0,5proz. Quecksilberazetatlösung, die mit Natriumazetat gesättigt ist, so viel zu, daß kein Niederschlag mehr entsteht. Der abfiltrierte und mit Wasser gewaschene Niederschlag wird mit H<sub>2</sub>S zersetzt. Aus dem vom Quecksilbersulfid und H<sub>2</sub>S befreiten Filtrat scheidet sich beim Einengen das Allantoin in kleinen glänzenden Prismen aus (Schmelzpunkt 234° unter Zers.)<sup>3)</sup>.

### Katalase.

Die Katalase katalysiert den Zerfall von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Wasser und Sauerstoff. Sie findet sich fast in allen pflanzlichen und tierischen Geweben und Flüssigkeiten.

Darstellung von Blutkatalase nach Tsuchihashi<sup>4)</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

<sup>1)</sup> Über Urikolyse vgl. Felix, Scheel und Schuler: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 180, S. 90. 1929.

<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.

<sup>3)</sup> Über Allantoinase vgl. Przylecki: Arch. Int. de Phys. Bd. 24, S. 238. 1925. Ferner Fosse und Mitarbeiter: C. r. Acad. Sci. Paris Bd. 189, S. 716. 1929. Fosse und Brunel: C. r. Acad. Sci. Paris Bd. 188, S. 426. 1929.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 63. 1923.

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 obenstehende Flüssigkeit filtriert. Aus dieser Lösung wird das Ferment mittels frischgefällten dreibasischen Kalziumphosphats<sup>1)</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>  $\frac{1}{150}$  m-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> versetzt, während 15 Minuten mehrfach umgerührt und abfiltriert. Die Elution ist wasserklar, gibt mit Sulfosalizylsäure eine ganz schwache Trübung und mit Salpetersäure und Silbernitrat fast keine Trübung mehr.

Darstellung von Leberkatalase nach Battelli und Stern<sup>2)</sup> und Hennichs<sup>3)</sup>.

1 kg fein zermahlene, vorher von Blut völlig befreite<sup>4)</sup> Pferdeleber wird mit 2 kg Wasser (mit etwas Alkohol, zu ca. 0,01 mol.) versetzt und durch ein Koliertuch gegeben. Das Filtrat wird mit der doppelten Menge 96proz. Alkohols bei Gefriertemperatur gefällt. Die Fällung (etwa 40 g) wird an der Luft getrocknet und im Vakuumexsikkator bei Lichtabschluß aufbewahrt. Man kann auch so verfahren, daß der mit 60proz. Alkohol gewaschene, zwischen Filterpapier gut ausgepreßte Niederschlag mit dem vierfachen

<sup>1)</sup> 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.

<sup>2)</sup> *Ergebn. d. Physiol.* Bd. 10, S. 544.

<sup>3)</sup> *Biochem. Zeitschr.* Bd. 145, S. 286. 1924.

<sup>4)</sup> Zu diesem Zwecke wird in die Pfortader eine Kanüle eingebunden, die etwa 5 Minuten lang unter stetem Druck mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült wird.

Volumen Wasser versetzt, mehrere Stunden umgerührt, dann zentrifugiert wird. Das katalytisch stark wirksame Filtrat wird wieder mit 2 Volumen Alkohol gefällt und der Niederschlag wie oben behandelt. Eine erneute Alkoholfällung erhöht die Wirksamkeit des gewonnenen Pulvers<sup>1)</sup>.

Zur Adsorption wird salzsäurebehandeltes Kaolin — das Kaolin wird mit starker Salzsäure mehrere Stunden gekocht und bis zur negativen Chlorreaktion dekantiert — benutzt (vgl. S. 7). 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. Euler und Josephson<sup>2)</sup> adsorbieren nach Fällung mit Alkohol unter Kühlung und Lösen in Wasser mit Tonerdehydrat A. (vgl. S. 4) und eluieren mit 0,02 n-NH<sub>3</sub>. Die Lösung wird dann mit Kaolin behandelt. Aus dem Adsorbat eluiert man die Katalase vollständig durch 0,02 n-NH<sub>3</sub>. Diese Elutionen werden im Eisschrank unter Verwendung von Kollodiummembranen dialysiert. Durch die Einführung der Dialyse bei niedriger Temperatur ist es möglich, die Aktivitätsverluste während der Dialyse sehr zu vermindern. In vielen Fällen konnten 4—5 Tage dauernde Dialysen ohne jeden Verlust an Aktivität ausgeführt werden.

#### 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

<sup>1)</sup> Morgulis benutzt ein durch zweimalige Azetonfällung des Leberauszuges gewonnenes Präparat.

<sup>2)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 452, S. 158; Bd. 455, S. 1. 1927.

gegen 0,005 n-KMnO<sub>4</sub> eingestellt, die wiederum gegen Sörensens Natriumoxalat gestellt wird.

Nach Tsuchihashi (l. c. S. 367): 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<sup>1)</sup>.

Zu 2. nach Morgulis<sup>2)</sup>. Die entwickelte O<sub>2</sub>-Menge wird in Eudiometerrohren 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 Gummischlauchver-

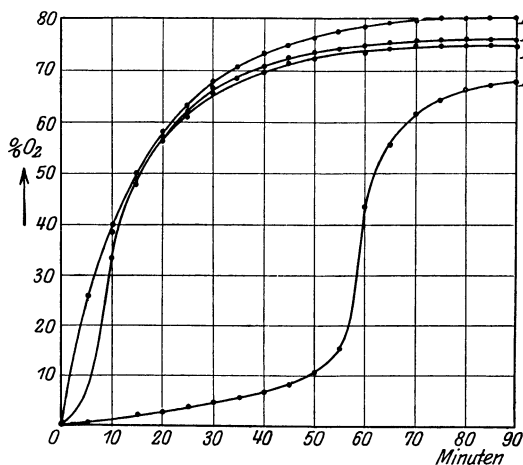


Abb. 101. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Entwickelter Sauerstoff. I KCN 0,001 n. II ohne Salz. III KCN 0,001 n. IV KCN 0,005 n.

bindung 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung dient und der innerhalb der Flasche

unter dem Stopfen angebracht ist. Mittels eines sich in dem Hals bewegenden graduierten Stempels kann die gewünschte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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,

<sup>1)</sup> Über Bestimmung der Katalase im Pflanzenmaterial vgl. Euler, K. Myrbäck und S. Myrbäck: Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 186, S. 212. 1930. <sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Vol. 47, S. 341. 1921.

bis keine Gasentwicklung mehr stattfindet. Das Reaktionsvolumen beträgt gewöhnlich 50 cm<sup>3</sup>, die Temperatur 20—21° C.

Beispiel [nach Rona und Damboviceanu<sup>1)</sup>] zugleich zur Demonstration der Neutralsalzwirkung. Ansätze: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) je 50 cm<sup>3</sup> liefern bei völliger Zerlegung bei 21,2° 750,5 mm Hg 58,23 cm<sup>3</sup> O<sub>2</sub>, Phosphatpuffer je 2,0 cm<sup>3</sup> (1/3 mol.,  $p_h = 6,85$ ). Fermentlösung 5,0 cm<sup>3</sup> (1 : 1000), und zwar in folgenden Verdünnungen: in 1. in 5,0 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser ( $p_h$  des Gemisches 6,65); in 2. in 5,0 cm<sup>3</sup> 0,154 mol. NaCl-Lösung ( $p_h$  des Gemisches 6,63); in 3. in 5,0 cm<sup>3</sup> einer Lösung von 0,154 mol. NaCl, 0,0025 mol. KCl und 0,0018 CaCl<sub>2</sub> ( $p_h$  des Gemisches = 6,11); in 4. in 5,0 cm<sup>3</sup> einer Lösung von 0,154 mol. NaCl, 0,0025 mol. KCl, 0,0018 mol. CaCl, 0,0011 mol. NaHCO<sub>3</sub> ( $p_h$  des Gemisches = 6,58). Vor Beginn des Versuches steht das Ferment 30 Minuten in der jeweiligen Lösung.  $p_h$  nach Schluß der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spaltung in allen Röhren 6,9.

Zahlen in der Tabelle: cm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> (21,2° und 750,5 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. 101 zeigt die reversible Giftwirkung des KCN auf die Katalase<sup>2)</sup>.

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<sup>3)</sup>.

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 orangegelb bis dunkelbraun bis schwarz. Statt Tyrosin kann man tyrosinhaltige

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 32, Tabelle XXI.

<sup>2)</sup> Rona, Fiegel u. Nakahara: Biochem. Zeitschr. Bd. 160, S. 272. 1925.

<sup>3)</sup> Über die Wirkung der Tyrosinase auf einige dem Tyrosin verwandte Stoffe vgl. Dulière und Raper: Biochem. Journ. Bd. 24, S. 239. 1930.

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 cm<sup>3</sup> einer 0,05proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zu etwa 10 cm<sup>3</sup> 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*)<sup>5)</sup> und die Drüse des Tintenfisches. Für pflanzliche Tyrosinasen liefert die Pilzgattung *Russula* das beste Material. Man kann aber auch Kartoffelschalen benutzen. Gewaschene und zerriebene Kartoffelknollen werden in einem Beutel in einer Handpresse ausgepreßt. Man läßt den frischen Saft etwa 1/2 Stunde stehen und zentrifugiert von der Stärke und sonstigen Beimengungen ab<sup>6)</sup>. Eine weitere Reinigung erfolgt, indem der so gewonnene Saft mit feinpulvertem Thymol kräftig durchgeschüttelt, dann bei Zimmertemperatur 2 Tage lang der Autolyse überlassen wird. Man reinigt weiterhin durch Dialyse in sog. Fischblasen (vgl. S. 9).

Zur Bestimmung der Tyrosinase<sup>7)</sup> dienen u. a. die Methoden von Bach<sup>8)</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 cm<sup>3</sup> Fermentlösung mit 10 cm<sup>3</sup> Tyrosinlösung (0,05 g Tyrosin, in 100 cm<sup>3</sup> einer 0,04proz. Natriumkarbonatlösung durch Erhitzen gelöst) zusammen, gibt 30 cm<sup>3</sup> Wasser zu und stellt das Gemisch auf 24 Std. in den Brutschrank. Nach Ablauf dieser Frist wird das Gemisch mit 1 cm<sup>3</sup> 10proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

<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.

<sup>5)</sup> Zehn Mehlwürmer werden mit etwa 10 cm<sup>3</sup> Chloroformwasser übergossen und in der Reibschale zerrieben. Man zentrifugiert von den großen Zellresten ab.

<sup>6)</sup> Haehn: Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 175. 1920. Vgl. auch Abderhalden und Behrens: Fermentforschung Bd. 8, S. 479. 1926.

<sup>7)</sup> Vgl. die Abhandlung von Haehn in Abderhaldens Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden. Abt. IV, Teil 1, S. 1070. 1931.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 41, S. 216. 1908.

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>1)</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 cm<sup>3</sup> einer 0,05 proz. Tyrosinlösung in einem Phosphatpuffer ( $p_h$  6,81  $\frac{1}{15}$  molar.) wurden 30 cm<sup>3</sup> (dialysierter) Kartoffelsaft hinzugefügt, ferner Toluol. Diese Proben wurden im Thermostaten bei 20<sup>0</sup> gehalten und ein konstanter mit Wasserdampf und Toluol gesättigter Luftstrom wurde hindurchgeleitet. Von Zeit zu Zeit wurden 20 cm<sup>3</sup> der Lösung entnommen, um daran die noch nicht umgewandelte Tyrosinmenge zu bestimmen. Dies geschah auf folgende Weise. Die entnommenen Proben wurden mit 0,5 cm<sup>3</sup> einer 10 proz. Essigsäure versetzt und aufgekocht, 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 Male mit heißem Wasser gewaschen, um alles anhaftende Tyrosin daraus zu entfernen. Dann wurde das Filtrat mit 1 cm<sup>3</sup> 10 proz. Natriumkarbonat alkalisch gemacht, die Lösung gekocht, die Flasche mit Watte verschlossen, 24 Stunden stehen gelassen, um auch die Vorstufen des Melanins in Melanin umzuwandeln; dann wird 2 cm<sup>3</sup> einer 10 proz. Essigsäure hinzugefügt, die Lösung gekocht, nach einigen Stunden filtriert. Hierauf wurde das Tyrosin nach der Methode von Millar<sup>2)</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 cm<sup>3</sup> NaBrO<sub>3</sub> (0,8502 g pro Liter; 1 cm<sup>3</sup> = 0,001527 g Tyrosin), 2 cm<sup>3</sup> 50 proz. KBr-Lösung und 7,5 cm<sup>3</sup> 20 proz. HCl-Lösung hinzugefügt, die Flasche verkorkt und 20 Min. stehen gelassen. Hierauf wurden 2 cm<sup>3</sup> 10 proz. KJ hinzugefügt und das freie Jod mit  $\frac{1}{15}$  n-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung titriert<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Biochem. Journ. Bd. 17. S. 454. 1923.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu Fürth und Fleischmann: Biochem. Zeitschr. Bd. 127. S. 143. 1921.

<sup>3)</sup> 1 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$  n-Natriumthiosulfatlösung entsprechen 0,0127 g Jod und 0,0127 g Jod entsprechen 0,002517 g NaBrO<sub>3</sub>.

H. Haehn und J. Stern<sup>1)</sup> beschreiben eine jodometrische Schnellmethode zur Bestimmung der Tyrosinase. I. Erforderliche Lösungen: 1. Phosphatpufferlösung prim: sek 1:1,  $\frac{1}{15}$  molar,  $p_h$  6,81. 2. Tyrosinlösung: 0,5 g Tyrosin in 500 cm<sup>3</sup> m/15 prim. Kaliumphosphat und 500 cm<sup>3</sup> m/15 sek. Natriumphosphat. 3. 10% Essigsäure. 4. 10% Sodalösung. 5. 10% BaCl<sub>2</sub>-Lösung. 6. NaBrO<sub>3</sub>-Lösung (0,8502 g im Liter). 7. 50% KBr-Lösung. 8. 10% KJ-Lösung. 9.  $\frac{1}{50}$  n-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (4,966 g im Liter). 10. Lösliche Stärke. 11. 20% HCl. — Zur Darstellung des Fermentes werden die gewaschenen und in der Reibschale zerkleinerten Kartoffelknollen in einen Beutel gefüllt und ausgepreßt. Man läßt den Saft 15—30 Minuten stehen und zentrifugiert die Stärke und die sonstigen Beimengungen ab. Auf die Tyrosinlösung bezogen wurden 10% Kartoffelsaft zugegeben. — II. Ausführung des Oxydationsversuches: In einem Stehkolben von 500 cm<sup>3</sup> bringt man 300 cm<sup>3</sup> Tyrosinlösung 30 cm<sup>3</sup> Kartoffelsaft und 10 cm<sup>3</sup> Toluol (eventuell noch einige Tropfen Maschinenöl). Man schickt einen mit Wasserdampf und Toluol gesättigten Luftstrom durch das Reaktionsgemisch. Der Kolben steht in einem Thermostaten von 20°. Ein Kontrollkolben mit 300 cm<sup>3</sup> Phosphatlösung (Lösung 1), 30 cm<sup>3</sup> Kartoffelsaft und 10 cm<sup>3</sup> Toluol dient zur Korrektur des Tyrosinwertes in bezug auf bromadsorbierende Substanzen des Fermentsaftes. Vor dem Beginn der Lüftung der beiden Versuche werden aus jedem Kolben Proben von je 20 cm<sup>3</sup> entnommen zur Bestimmung der Anfangskonzentration des Tyrosins. Man versetzt sie sofort mit 0,5 cm<sup>3</sup> 10proz. Essigsäure, kocht auf, filtriert nach 10 Minuten, wäscht den Melanin-Eiweißniederschlag zur Entfernung des anhaftenden Tyrosins dreimal mit heißem Wasser, dann mit 10 cm<sup>3</sup> 10proz. Sodalösung. Dann wird aufgeköcht und die Probe mit 4 cm<sup>3</sup> 10proz. BaCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt. Nach dem Aufkochen wird filtriert, der Niederschlag zwei- bis dreimal mit heißem Wasser ausgewaschen. Jetzt werden 10 cm<sup>3</sup> 10proz. Essigsäure zugefügt, die Lösung wieder gekocht, dann auf Zimmertemperatur abgekühlt. Sind sie klar geblieben, so wird sofort titriert; anderenfalls muß noch einmal filtriert werden. Alle nach bestimmten Zeitintervallen entnommenen Proben werden ebenso behandelt. III. Bestimmung des (übriggebliebenen) Tyrosins: Man versetzt die Tyrosinlösung mit 10 cm<sup>3</sup> der Natriumbromatlösung (= 16,5 cm<sup>3</sup> n/50 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 2 cm<sup>3</sup> der 50proz. Kaliumbromidlösung und 7,5 cm<sup>3</sup> der 20proz. Salzsäure, verkorkt die Flasche und läßt 20 Minuten stehen. Dann werden 2 cm<sup>3</sup> der 10proz. Jodkaliumlösung zugefügt und das freie Jod mit  $\frac{1}{50}$  n-Natriumthiosulfat

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 184, S. 182. 1927.



titriert. (Ein Mol Natriumbromat liefert 6 Atome Brom, 4 Atome Brom entsprechen einem Mol Tyrosin. Folglich  $2 \text{ NaBrO}_3 \rightarrow 3 \text{ Tyrosin}$ ;  $302 : 543,4 = 0,8502 : x$ ,  $x = 1,531 \text{ g Tyrosin}$ , also  $1 \text{ cm}^3 \text{ Bromat } 0,00153 \text{ g Tyrosin}$ .)

H. Schmalfuß und H. Lindemann<sup>1)</sup> konnten zeigen, daß 1- $\beta$ -3-4-Dioxyphenyl- $\alpha$ -aminopropionsäure (= *D*) im Gegensatz zu anderen Chromogenen sich leicht (fermentativ) in Melanin überführen läßt, ohne daß das gebildete Melanin in verdünnten Lösungen ausflockt. (Hierbei wird „Melanin als Sammelbegriff für die braunen bis schwarzen Farbstoffe gebraucht, die aus Phenolabkömmlingen durch Oxydation entstehen.) Farbton und Farbtiefe einer bestimmten Melaninlösung wechseln mit ihrer Schichthöhe; aus Farbwechsel allein darf also nicht auf chemische Umwandlung oder Änderung des Dispersitätsgrades geschlossen werden. Die endlichen Farbtiefen und Farbtöne von Melaninlösungen aus *D* sind unter sonst gleichen Umständen gleich, einerlei, ob das Melanin spontan oder fermentativ entstand.

Eine Methode, Dioxyphenylaminopropionsäure (*D*) neben Tyrosin nebeneinander in Lösungen von der Konzentration  $m/2000$  bis  $m/30000$  zu bestimmen, besteht im folgenden. Die Vergleichslösung für die kolorimetrische Bestimmung des gebildeten *D*-Melanins (eingestellt wurde auf gleiche scheinbare Helligkeiten, ohne die geringen Unterschiede im Farbton zu berücksichtigen) wurde wie folgt hergestellt:  $100 \text{ cm}^3$  einer  $m/10000$  *D*-Lösung in Puffer von  $[H] = 2,10^{-8}$  bis  $5,10^{-9}$ \*) werden in einer Flasche von  $250 \text{ cm}^3$  24 Stunden lang im Brutschrank auf  $38^\circ$  gehalten, oder man lüftet die Lösung 6 Stunden lang bei  $40^\circ$  durch. Die Vergleichslösung wird nach 3 Tagen erneuert. Bei der kolorimetrischen Bestimmung von *D* werden in einer Flasche von  $250 \text{ cm}^3$   $20\text{--}50 \text{ cm}^3$  der zu prüfenden Lösung mit der gleichen Menge obiger Pufferlösung und 1 Tropfen Toluol versetzt. Das Gemisch bleibt unter Sauerstoff bei Atmosphärendruck im Brutschrank bei  $35\text{--}40^\circ$  so lange verschlossen stehen, bis es nicht mehr dunkler wird. Nach je 24 Stunden wird das Gemisch mit der Vergleichslösung verglichen. Läßt man *D* und Tyrosin oxydieren, dann dunkelt *D* bei der geeigneten Wasserstoffionenkonzentration spontan, Tyrosin hingegen nicht. Die Menge Tyrosin läßt sich neben *D* als Differenz bestimmen, sobald die Gesamtmenge beider Aminosäuren

1) Biochem. Zeitschr. Bd. 184, S. 10. 1927.

\*) Phosphatpuffer von  $[H] = 0,12 \cdot 10^{-8}$ ;  $12 \text{ cm}^3 m/3 \text{ Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 + 200 \text{ cm}^3 m/3 \text{ Na}_2\text{HPO}_4 + 1788 \text{ cm}^3 \text{ Wasser}$ . Boratpuffer von  $h = 7,7 \cdot 10^{-9}$ — $5,9 \text{ cm}^3 m/5 \text{ NaOH} + 50 \text{ cm}^3 m/5 \text{ H}_3\text{BO}_3 + m/5 \text{ KCl} + 144,1 \text{ cm}^3 \text{ Wasser}$ .

und die Menge  $D$  bekannt ist. Verfasser verfahren hierbei wie folgt: Je  $1 \text{ cm}^3$  der zu untersuchenden Lösungen und der Vergleichslösung ( $m/300 D$ ) werden mit je  $1 \text{ cm}^3$  einer 10proz. wässrigen Pyridinlösung und  $1 \text{ cm}^3$  einer frisch bereiteten 2proz. Lösung von Triketohydrindenhydrat versetzt und 20 Minuten lang im Wasserbad erhitzt. Dann läßt man abkühlen und verdünnt jeweils mit Pufferlösung ( $h = 0,12 \cdot 10^{-8}$ ) auf  $100 \text{ cm}^3$ . Die scheinbaren Helligkeiten dieser Lösungen werden in einem Kolorimeter verglichen.

Qualitativ läßt sich die Dioxyphenylaminopropionsäure mit der Prüfstreifenmethode von Schmalfuß<sup>1)</sup> nach K. Hasebrock feststellen. Die Streifen werden hergestellt<sup>2)</sup>, indem man dem Rückengefäß des betreffenden Insektes, z. B. des Mehlkäfers (*Tenebrio molitor*) mit einer Kapillare die Hämolymphe entnimmt und dann mit der herausgezogenen Kapillarenspitze über einen Filtrierpapierstreifen von 30 cm Länge und 3 cm Breite hinstreift. So tränkt man eine 3 mm breite Randzone des Streifens. Nun trocknet man so schnell wie möglich im luftverdünnten Raum über Phosphorpentoxyd, da die getränkten Stellen sonst oft spontan dunkeln. Dann werden die getränkten Filtrierpapierstücke senkrecht zur getränkten Zone in 1 mm breite Prüfstreifen zerschnitten. Eine einzige Raupe lieferte so 1000 Prüfstreifen. Die Prüfstreifen halten sich, trocken und kühl aufbewahrt, wenigstens 15 Monate lang. Durch das Trocknen der Streifen geht das Ferment in einen unlöslichen Zustand über. Bringt man einen Prüfstreifen bei Gegenwart von Sauerstoff in eine wässrige Dioxyphenylalaninlösung, so bildet sich an der Berührungsstelle Ferment — Substrat das Melanin. Man läßt die Prüfstreifen mindestens einen Tag altern, da die fermentative Kraft bis dahin noch zunimmt. Mit Hilfe unverdünnter Fermentlösungen z. B. aus den Larven des Mehlkäfers konnte Schmalfuß noch  $\frac{4}{10000000}$  ‰ Dioxyphenylalanin nachweisen.

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.

<sup>1)</sup> Vgl. Schmalfuß, H. und H. Werner: Fermentforschung Bd. 8, S. 116. 1924 und H. Schmalfuß: Die Naturwissenschaften Bd. 15, S. 453. 1927. Hier auch Literatur.

<sup>2)</sup> Nach Schmalfuß: Naturwissenschaften, l. c. S. 454.

<sup>3)</sup> Bertrand: Bull. soc. chim. Serie 3, Bd. 13, S. 361. 1896; Serie 3, Bd. 17, S. 621. 1897.

Bertrand trennt Tyrosinase und Lakkase aus *Russula delica* wie folgt<sup>1)</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.

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

Das Ferment katalysiert die Umwandlung von Salizylaldehyd in Salizylsäure. Es ist in Milz, Pankreas, Leber und Lunge und in der Nebennierenrinde des Rindes enthalten.

Der Nachweis beruht darauf, daß Salizylsäure mit Eisenchlorid eine dunkelblaue Farbe gibt, während Salizylaldehyd mit Eisenchlorid nicht reagiert.

Eine Isolierung des Fermentes aus frischer Rinderleber hat M. Jacoby<sup>3)</sup> ausgearbeitet. Der Rinderleberbrei wird mit dest. Wasser (unter Toluolzusatz) extrahiert, der kolierter und filtrierte 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<sup>1</sup>/<sub>3</sub> 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 Salizylaldehyd kräftig zu Salizylsäure.

<sup>1)</sup> Comptes rend. Bd. 123, S. 460. 1896 (nach Wohlgemuth: Fermentmethoden S. 267).

<sup>2)</sup> Salkowski, E.: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 147, S. 1. 1898.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 30, S. 135. 1900.

### Peroxydase aus Meerrettich.

Darstellung von Willstätter und Stoll<sup>1)</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 kristallisierte Oxalsäure enthält, 3 Stunden 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<sup>0</sup>/<sub>100</sub> mit Oxalsäure versetzt ist, 1—2 Stunden 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 mit der Buchner Presse von dem Preßkuchen. Der Preßkuchen wird zur Isolierung des Fermentes von neuem mit 1 $\frac{1}{4}$  l bei 20° gesättigtem Bariumhydroxyd verrieben. Man kann den Preßkuchen noch zweimal mit je 1 $\frac{1}{2}$  l halbgesättigter Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung extrahieren. Auf diese Weise gewinnt man einen sehr wirksamen Fermentauszug. Dieser wird sofort unter Schütteln in einer Stöpselflasche mit CO<sub>2</sub> bis zur schwach sauren Reaktion behandelt, dann mit  $\frac{9}{10}$  seines Volumens 96proz. Alkohol versetzt. Die Peroxydase bleibt dabei in Lösung. Nachdem die Lösung eine Nacht im Eisschrank gestanden hat, läßt sich diese durch eine Schicht von grobem Talk über einem Koliertuch klar absaugen. Diese wässerig-alkoholische Fermentlösung wird im Vakuum bei 30° auf 50—70 cm<sup>3</sup> 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.

Eine sehr weitgehende Reinigung des Fermentes gelingt durch wiederholte Adsorption durch Kaolin und Tonerde aus 50proz. alkoholischer Lösung und Fällung mit Tannin. Der Gang einer solchen Reinigung soll in folgendem Beispiel<sup>2)</sup> skizziert werden. Die Peroxydase (aus Rüben, in dem Beispiel 0,818 g) wird mit

<sup>1)</sup> Ann. d. Chemie Bd. 416, S. 21; Bd. 422, S. 47; Bd. 430, S. 269. 1917/18.

<sup>2)</sup> Willstätter und Stoll: Annalen der Chemie. Bd. 430, S. 269. 1917/18. Vgl. auch die Mitteilung von Kuhn, Hand und Florkin; Zeitschr. f. physiolog. Chemie Bd. 201, S. 255. 1931.

Wasser auf 1 l gebracht und mit Essigsäure bis auf  $\frac{1}{50}$  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 eingengt. Diese Lösung wird auf das Volumen von 1 l und 50% Alkohol gebracht und mit Aluminiumhydroxyd (Sorte A, 3,2 g) adsorbiert. (Im allgemeinen braucht man für 4—5 l aus 5 kg Wurzeln gewonnene wässrig-alkoholische Barytauszüge, aus denen durch Luftstrom die überschüssige CO<sub>2</sub> verjagt worden ist, 10—15 g Aluminiumhydroxyd, aufgeschwemmt in 400—500 cm<sup>3</sup> Wasser. Alle 2—3 Minuten werden unter kräftigem Schütteln 20—30 cm<sup>3</sup> Al(OH)<sub>3</sub> eingetragen.) Das Adsorbat setzt sich in 1—2 Stunden ab oder es wird abzentrifugiert; danach wird es in Zentrifugengläschen mit eiskaltem Wasser angerührt. Dann leitet man  $\frac{1}{4}$  Stunde Kohlensäure unter starkem Schütteln ein, wodurch das Ferment leicht eluiert wird. — 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 1proz. 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 0,1proz. Ammoniak zerlegt. Die mit Essigsäure neutralisierte Elution wurde wieder aus 50proz. Alkohol mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> adsorbiert. Die Elution wird eingengt 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 kolorimetrisch ermittelt.

2,0 l 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 0,5proz. Hydroperoxydlösung (aus Merckschem Perhydrol 1:60 verdünnt) 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—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> 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 Kolorimeter mit einer Vergleichslösung verglichen, die 100 mg aus Alkohol und Äther umkristallisiertes Purpurogallin im Liter Äther enthält.

Die in irgendeinem Peroxydasepräparat vorhandene Fermentmenge 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöst in 2 l Wasser von 20° in 5 Minuten gebildet wird.

Unter Peroxydaseeinheit ist 1 g peroxydasehaltige Substanz von der Purpurogallinzahl 1 oder 1 mg Enzymmasse von der PZ 1000 zu verstehen. Diese Einheit entspricht im allgemeinen dem Peroxydasegehalt von 5 g frischer Meerrettichwurzel.

Willstätter und H. Weber haben eine quantitative Bestimmung der Peroxydase mit Hilfe von Leukomalachitgrün ausgearbeitet<sup>1)</sup>. Die Farbintensität dieses Triphenylmethanfarbstoffes ist bedeutend größer als die des Oxydationsproduktes aus Pyrogallol (vgl. S. 379). Während erst 1 mg Purpurogallin in 100 cm<sup>3</sup> Äther kolorimetrisch gemessen werden kann, genügen von Malachitgrün 0,0025 mg in 100 cm<sup>3</sup> Wasser. Man arbeitet mit 10 mg Leukobase, und mißt den Farbstoff unmittelbar in der Versuchslösung. Mit der viermal (zweimal aus Alkohol, dann aus Ligroin und nochmals aus Alkohol) umkristallisierten Leukobase wird titrierte  $\frac{1}{20}$  n-Essigsäure bei 20° gesättigt. (Die Lösung an der Pumpe von Luft befreit, hält sich monatelang, ohne grünliche Farbe anzunehmen.) Wenn beim Aufbewahren die Temperatur 20° unterschritten wurde, so erwärmt man vor dem Versuch die Lösung im Aufbewahrungsgefäß, um die ausgeschiedene Substanz wieder aufzulösen. Vor der Bestimmung, also unmittelbar vor dem Eintragen des Hydroperoxyds und der Fermentprobe, wird Natriumazetat zugesetzt, und zwar 2 cm<sup>3</sup> 0,166 n-toluolgesättigte Lösung von Natriumazetat puriss. pro analysi Merck. Das Hydroperoxyd wird aus reinem Perhydrol Merck (nicht Tropensorte) durch Verdünnen aufs Hundertfache bereitet und vor dem Gebrauch mit Permanganat eingestellt. Aus der Titration wird die weitere Verdünnung berechnet, um 0,25 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stets im gleichen Volumen von 1,0 cm<sup>3</sup> zu haben. Die Substratlösung (100 cm<sup>3</sup>) wird im Thermostaten von 20° mit dem Natriumazetat, dem Hydroperoxyd und der Peroxydaseprobe vermischt, die

<sup>1)</sup> Ann. d. Chemie Bd. 449, S. 156. 1926.

0,0025—0,05 Peroxydaseeinheiten in höchstens 5 cm<sup>3</sup> enthalten soll (die Fermentlösung soll vorher von etwa vorhandenen Toluoltropfen durch Filtrieren befreit werden). Während der Reaktionszeit pipettiert man 10 cm<sup>3</sup> n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ein Kölbchen, um sie im Augenblick des Reaktionsablaufs (5 Min.) in einem Gusse einzutragen und so die fermentative Spaltung augenblicklich zu unterbrechen. Der in Kölbchen zurückbleibende Rest der Säure wird mit 5 cm<sup>3</sup> Wasser nachgespült. Nach 15 bis 30 Sekunden Einwirkung neutralisiert man die Mineralsäure mit ein wenig mehr als der äquivalenten Menge Sodalösung, um den Farbstoff wieder herzustellen und entfernt die Kohlensäurebläschen vor dem Kolorimetrieren durch kräftiges Schütteln. Die Bestimmung des gebildeten Malachitgrüns erfolgte im Dubosq'schen Kolorimeter. Die Vergleichslösung enthielt 10,00 mg Malachitgrün im Liter und wurde am besten in 5—10 mm Schichthöhe verwendet. Die Standardlösung mit Wasser bereitet, ist nicht beständig, doch kann die Hydrolyse durch Anwendung von  $\frac{1}{20}$  n-Essigsäure zurückgedrängt werden; man muß auch die Flüssigkeit mit Toluol versetzen, um sie haltbar zu machen. Für die kolorimetrische Messung von Malachitgrün ist künstliches gelbes Licht geeigneter als Tageslicht. Ist das Ferment an Suspensionen, z. B. in Pflanzenmaterial vorhanden, so muß man berücksichtigen, daß der Farbstoff adsorbiert wird. Für die Isolierung von adsorbiertem Malachitgrün eignet sich Chloroform besser als Wasser. Was das Malachitgrünäquivalent der Purpurogallinzahl anlangt, so entsprechen 1 mg Purpurogallin, das unter den auf S. 380 geschilderten Bedingungen entsteht, 0,053 mg Malachitgrün unter den angegebenen Verhältnissen. Also ist eine Peroxydaseeinheit gleich 1 mg Ferment von der Malachitgrünzahl 53 (d. h. unter den angegebenen Bedingungen 53 mg Malachitgrün bildend).

#### Thunbergs Methylenblaumethode zum Studium der Dehydrasen<sup>1)</sup>.

Prinzip: Zur Verfolgung der Wasserstoffaktivierung werden Indikatoren (spez. Methylenblau) benutzt, die mit dem aktivierten Wasserstoff reagieren und dabei leicht bemerkbare Veränderungen (Entfärbung) zeigen. Zur Aufnahme des Reaktionsgemisches dient ein Vakuumrohr von beistehender Form (vgl. Abb. 102). Es ist ein, an dem einen Ende zugeschmolzenes, etwa 10 cm<sup>3</sup> haltendes Glasrohr aus gehärtetem, farblosem Glas, das an dem anderen Ende

<sup>1)</sup> Darstellung nach Thunberg in Oppenheimer-Pincussen, Fermentmethoden. S. 1118.

mit einer Öffnung versehen ist. Diese Öffnung kann mit einem konischen, sehr gut eingeschliffenen Glasstöpsel geschlossen werden. Der Glasstöpsel ist zwischen dem obersten und mittleren Drittel seiner Höhe mit einem Loch von 2—3 mm Durchmesser versehen. Am Rohre ist in entsprechender Höhe ein Seitenrohr an-

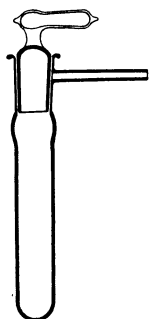


Abb. 102.

gesetzt, das durch Drehen des Glasstöpsels gesperrt werden kann. Dieses Seitenrohr wird durch einen Vakuumschlauch mit einer Vakuumpumpe verbunden. Für eine Versuchsserie braucht man 12—18 Röhren von gleichem Kaliber und gleicher Länge. Der Stöpsel muß mit Vakuumschmiermittel eingefettet werden. Eine kräftige Wasserstrahlpumpe genügt zum Evakuieren der Vakuumröhren, die während des Versuches in einem mit Wasser gefüllten Thermostat stehen. Die Vorderwand des Thermostaten besteht aus einer gewöhnlichen Glasscheibe; vorteilhaft benutzt man als hintere Wand eine Milchglasscheibe und eine solche liegt auch auf dem Boden. Diese Vorrichtung erleichtert die Beobachtung

der Farbenveränderungen in der Vakuumröhre. Die Temperatur soll innerhalb  $0,1^{\circ}$  konstant sein.

#### Erforderliche Reagentien<sup>1)</sup>:

1. Methylenblauschlorid  $C_{16}H_{18}N_3SCl$  Mol.-Gew. 319,46 im Vakuum getrocknet mit  $3 H_2O$  Mol.-Gew. 373,46. Nur das Chlorid (nicht das Zinkdoppelchlorid) ist zu verwenden. Zu empfehlen ist das Methylenblau medicinale Merck. Für Versuche ist es praktisch etwa  $100\text{ cm}^3$  von je einer Lösung von etwa 5,  $2\frac{1}{2}$ , 1,  $\frac{1}{2}$  und  $\frac{1}{4}$  millimolar fertig zu halten. Sie sind vor Licht geschützt mehrere Monate haltbar.

2. Kaliumphosphat zweibasisch (Mol.-Gew. 174,25) Kaliumphosphat einbasisch (Mol.-Gew. 136,16). Beide Lösungen werden in halbmolaren Lösungen vorrätig gehalten.

3. Verschiedene Wasserstoffdonatoren. Als gute Donatorsubstanzen für tierische Organe wirken Fleischmilchsäure und Bernsteinsäure. Das Reaktionsgemisch kann von diesen Säuren zu 0,2—0,5% (in Form ihrer neutralen Kalisalze) enthalten. Man kann auch eine neutralisierte 0,5proz. Lösung von Liebigs Fleischextrakt als Donatorsubstanz verwenden. Es ist zu beachten, daß beim Neutralisieren der Säuren in dem Reaktionsgemisch Phenolphthalein nicht zu verwenden ist<sup>2)</sup>, da dieses schon in

<sup>1)</sup> Vgl. auch Lehmann: Skand. Arch. Physiol. Bd. 58, S. 45. 1929.

<sup>2)</sup> Wahrscheinlich verhalten sich andere Indikatoren auch so.



minimalen Konzentrationen die Oxydationsprozesse hemmt. Die zur Neutralisierung nötige Menge Lauge ist daher mit dem Indikator an einem kleinen aliquoten Teil des Reaktionsgemisches auszuprobieren und die berechnete Menge Lauge in der Hauptportion anzuwenden.

Das zu untersuchende tierische Material muß um eine möglichst innige Berührung zwischen Organmasse und Zwischenflüssigkeit zu bewirken, mit der Schere gründlichst zerkleinert werden. Die fertige Gewebsmasse wird dann in einem kleinen, verkorkten Becherglas, in einer Schale oder Thermosflasche mit kleinen Eisstücken versehen, verwahrt. Das Abwiegen von Muskelbreiportionen erfolgt am raschesten auf einer Torsionswaage von Hartmann & Braun (vgl. Prakt. II, S. 343). Man wendet gewöhnlich Mengen von je 0,2 g, die in ein Flüssigkeitsvolumen von 1 cm<sup>3</sup> eingeführt werden. Nachdem die Vakuumröhre mit dem Reaktionsgemisch versehen ist, werden die Glasstöpsel eingefettet und eingesetzt und während etwa 1½ Minuten evakuiert. Während des Evakuierens wird mit dem Rohre fortwährend gegen die Tischplatte oder eine Korkplatte gestoßen, um Schaumbildung zu verhüten. Das Evakuieren wird fortgesetzt, bis die Flüssigkeit beim Erwärmen des Rohres mit der Hand siedet. Während die Vakuumpumpe noch saugt, wird das Rohr nebst Seitenrohr unter die Wasserfläche eines Wasserbehälters geführt, der Glasstöpsel umgedreht und der Kautschukschlauch von dem Seitenrohr entfernt. So wird das Seitenrohr zum besseren Abschluß gegen die Luft mit Wasser gefüllt. Hiernach wird das Rohr aus dem Wasser herausgenommen und wenn nötig (um den etwa an der Innenwand haftenden Inhalt in die Bodenflüssigkeit zu bringen) zentrifugiert und dann in den Thermostaten gestellt. Als Entfärbungszeit ist am besten etwa 30 Min. zu nehmen.

Beispiel eines Versuches mit Succinodehydrogenase (nach Thunberg: l. c. S. 1126).

Darstellung der Bernstein-Dehydrogenase aus Fleisch. Erforderliche Reagentien: Chlornatrium, kalkfrei. Sekundäres Natriumphosphat nach Sörensen mit 2 H<sub>2</sub>O (Mol.-Gew. 178 oder gewöhnliches mit 12 H<sub>2</sub>O (Mol.-Gew. 358). Die angewandte  $\frac{1}{15}$  mol. Lösung von dem Dinatriumphosphat ist 1,2 bzw. 2,4proz.

Herstellung der Dehydrasenlösung. Pferde- oder Ochsenfleisch wird von Fett, Faszien, Nerven befreit in einer gewöhnlichen Fleischmühle gemahlen. 100 g davon werden wiederholt mit kleinen Portionen 0,25proz. Kochsalzlösung übergossen und geknetet, die Kochsalzlösung abgepreßt und die Behandlung mit der Kochsalzlösung wiederholt, bis die Masse weiß

(weißgrau) geworden ist. Der größte Teil des Kochsalzes wird dann durch Kneten mit der zweifachen Menge destillierten Wassers fortgeschafft. Hierauf wird die Muskelmasse in einem Tuch durch schwaches Auspressen von überschüssigem Wasser befreit und darauf mit einer kleinen Menge einer  $\frac{1}{15}$  mol. Lösung von sekundärem Natriumphosphat zu einem Brei während 10 Min. verrieben. Dann wird mehr Natriumphosphat, im ganzen  $200 \text{ cm}^3$  zugesetzt. Das Gemisch wird dann in einer Schüttelmaschine 30 Min. lang langsam geschüttelt. Die Mischung wird zentrifugiert. Die über dem Bodensatz stehende Fermentlösung wird abgossen. Sie enthält etwa 15 mg Eiweiß und besitzt das Vermögen, Metylenblau zu entfärben, wenn entweder bernsteinsaures Kalium oder glyzerinphosphorsaures Kalium anwesend sind. Die Dehydraselösung wird in einem Rohr verwahrt, das in einer mit Eis gefüllten Thermosflasche steht. Sie hält sich so etwa eine Woche.

In einer Versuchsreihe zum Studium der Beeinflussung der Metylenblau-Entfärbung durch Uretane oder Phenole<sup>1)</sup> wurden in jedes von einer Anzahl (z. B. 8) Vakuumröhren  $1 \text{ cm}^3$  der wie oben angegebenen bereiteten Fermentlösung gegeben, ferner  $1 \text{ cm}^3$  einer Lösung, die pro  $100 \text{ cm}^3$  0,5 g Kaliumsuccinat und 0,05 g Metylenblau enthält. In die einzelnen Röhrchen kommen dann aufsteigende Mengen Phenol (z. B. 0,2—1,0  $\text{cm}^3$  einer  $\frac{1}{10}$  molaren und 0,6—0,8  $\text{cm}^3$  einer  $\frac{1}{5}$  molaren Phenollösung). In jedem Rohr wird das Reaktionsgemisch mit destilliertem Wasser auf  $3 \text{ cm}^3$  aufgefüllt. Man notiert in jedem Rohr die Entfärbungszeit.

### 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>2)</sup>], die zweite die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin darstellt<sup>3)</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

<sup>1)</sup> Vgl. Thunberg: l. c. S. 1126.

<sup>2)</sup> Vgl. jedoch Stüber, F. u. F. Focke: Biochem. Zeitschr. Bd. 154, S. 77. 1924.

<sup>3)</sup> Über die Theorien der Blutgerinnung. Vgl. Oppenheimer: Die Fermente. S. 1178.

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>1)</sup>.

#### Gewinnung von Fibrinogenlösungen [Modifikation der Methode von Hammarsten nach Nolf<sup>2)</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<sup>0</sup>/<sub>0</sub> betragen). Das Blut wird scharf abzentrifugiert, das abgehobene, völlig zellfreie Plasma auf 0<sup>0</sup> abgekühlt und bei niedriger Temperatur filtriert. Das Plasma bleibt bei 0<sup>0</sup> eine Nacht stehen, wobei ein nukleoproteidhaltiger Niederschlag ausfällt, der Proferment (also wohl Thrombogen und Thrombokinasen) enthält, und der entfernt wird. Das eiskalte, filtrierte Plasma wird mit wenig verdünnter Essigsäure gegen Lackmuspapier neutralisiert. Dann wird reines, kalkfreies Kochsalz zugesetzt, bis 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 Fällen 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

<sup>1)</sup> Vgl. hierzu Starlinger: Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 220, 1923.

<sup>2)</sup> Nach Morawitz: Abderhaldens Handb. Bd. 5, S. 254. 1912.

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 so viel NaCl zu, daß die Salzkonzentration ungefähr 1% beträgt. Die Fibrinogenlösung bleibt bis zum nächsten Tage bei 0° stehen und wird durch Leinen koliert. Aus 1 l Plasma erhält man ungefähr 150—500 cm<sup>3</sup> Fibrinogenlösung. Sie wird zum Versuch mit der 5—10fachen Menge 1 proz. 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 (vgl. S. 28), 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. 384). Die Versuchsdauer soll dabei vom Beginn der Blutentnahme an gerechnet 15—20 Min. nicht überschreiten. Das zentrifugierte Plasma wird mit paraffinierter 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°) zu halten, wodurch eine raschere Abkühlung des eingeschlossenen Plasmas erfolgt, und erst nach 3—4 Min. auf 17,5° zu erhöhen. Bei guter Technik, die vor allem in peinlichster Sauberkeit (Staubfreiheit) der zur Verwendung kommenden Gefäße 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-Zitrat zu verwenden, das bis zur Konzentration von 0,2 % als Pulver eingetragen wird<sup>2)</sup>. Der Eigenbrechungs-

<sup>1)</sup> Starlinger: Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 203. 1923 (hier auch Beschreibung früherer Methoden). Vgl. auch Baumann: Zeitschr. f. exper. Med. Bd. 68, S. 707. 1929.

<sup>2)</sup> Als gerinnungshindernde Salzminima sind für Natriumoxalat 0,1%, für Natriumfluorid 0,2%, für Natriumzitrat 0,1—0,2% anzunehmen.

wert 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 Zitratplasma 5 Min. auf 55° 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°, 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>1)</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. 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>2)</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

<sup>1)</sup> Nach Morawitz: Abderhaldens Handb. Bd. 5, S. 275. 1911.

<sup>2)</sup> Howell: Americ. Journ. of Physiol. Vol. 26, S. 1. 1910 (zit. nach Morawitz: Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden V, Bd. 1, S. 276. 1911.

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 so lange 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>1)</sup>. Das Thrombin läßt man durch Kasein adsorbieren, indem man 1 g Kasein in 100 cm<sup>3</sup> Serum im Schüttelapparat auflöst. Darauf wird das Kasein durch 30 proz. Essigsäure ausgefällt. Man trocknet dann die Fällung im Exsikkator 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 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 94 proz. 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.

---

<sup>1)</sup> Tsunoo: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 205, S. 255. 1924.

Bereitung von Thrombokinasen 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 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  $1,0 \text{ cm}^3$ , in das zweite  $0,5 \text{ cm}^3$ , in das dritte  $0,25 \text{ cm}^3$ , in das vierte  $0,125 \text{ cm}^3$  usw. bringt und daß für die hierbei notwendigen Verdünnungen ausschließlich 1 Proz. Kochsalzlösung verwandt wird. Hiernach werden je  $2 \text{ cm}^3$  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

<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).

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 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

<sup>1)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. 1912. Nr. 28



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 Ausfließgeschwindigkeit des Blutes aus einer engen Glaskapillare gemessen.

Apparatur: Das Koagulometer besteht aus 4 gläsernen Teilen, von denen 2 durch Schliff, die übrigen durch Gummischlauch aneinandergefügt werden (vgl. Abb. 103).

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.

C. Die Aufsatzkapillare ist ein kurzes, kapillares 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 Aufsatzkapillare und dadurch bedingter Änderungen des Widerstandes; es wird lose mit Watte ausgestopft (6) und kann mit der Aufsaugkapillare 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

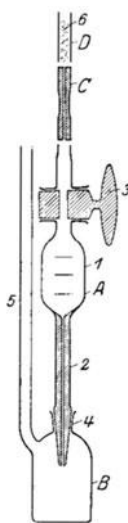


Abb. 103.

<sup>1)</sup> Heubner u. Rona: Biochem. Zeitschr. Bd. 130, S. 463. 1922.

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 Kapillare 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 Aufsatzkapillare, 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 Röhrchen hervorragen.

<sup>1)</sup> Wien. klin. Wochenschr. Bd. 34, S. 344. 1924.

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 cm<sup>3</sup> Blut.

Methode von Wöhlisch<sup>1)</sup>.

Die die Gerinnung beeinflussenden Faktoren wie Temperatur, Berührung mit Fremdkörpern, Bewegung werden durch Verwendung eines besonderen Thermostaten und möglichst gleichmäßiges Bewegen konstant gehalten.

Apparatur: Der Thermostat ist in der Abb. 104 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 Thermometer *Th*<sub>1</sub> 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 Wärme-

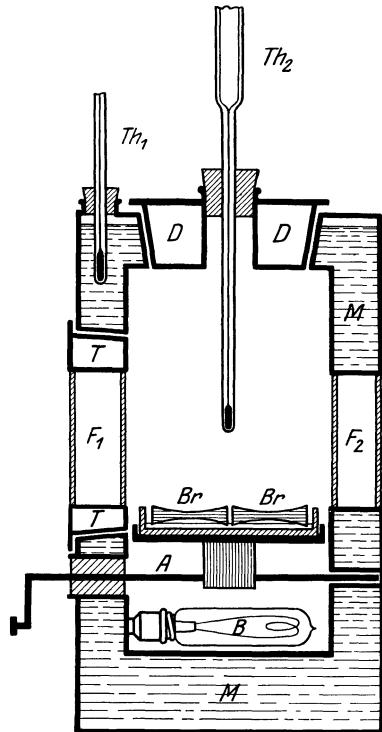


Abb. 104.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 27, S. 61. 1922.

verlusten 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 genau gegenüberliegend, an der Hinterwand zur Beleuchtung des Innenraumes durch Tageslicht oder durch eine künstliche Lichtquelle. Die Fenster sind als Doppelfenster ausgebildet, zwecks besserer Wärmeisolierung. Während das hintere Fenster fest eingekittet ist, liegt das vordere Fenster in einer doppelwandigen Blechtür  $T$ , die den Zugang zum Innenraum des Apparates gestattet. Sowohl die Tür als auch das Dach des Apparates erlauben mittels einer Gummidichtung einen luftdichten Verschuß. Das feste Anpressen der Tür und des Daches wird durch drehbare Riegel besorgt.

Dicht über dem Boden des Apparates ist in horizontaler Lage eine schmale, zylindrisch geformte Glühbirne  $B$  angebracht, die als Wärmequelle für das Innere dient, um dieses durch kurzes Einschalten des Stromes schnell auf die gewünschte Temperatur bringen zu können. Dicht unterhalb der Mitte der Tür führt unter luftdichtem Abschluß quer durch den 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 Petrischale 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 Einspritzen 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.

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,

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 27, S. 82. 1922.

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

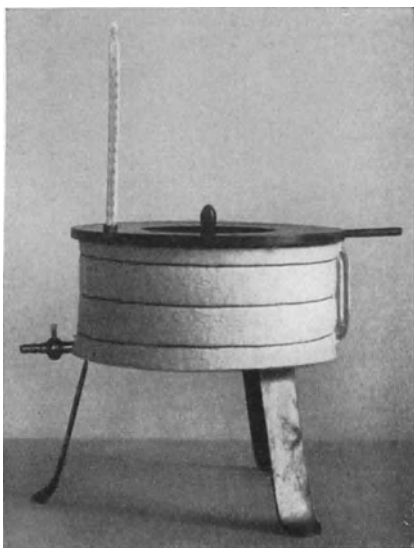


Abb. 105. Apparat zur Ermittlung der Blutgerinnungszeit.

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.

Eine empfehlenswerte Methode zur Messung der Blutgerinnungszeit verdanken wir K. Bürker<sup>1)</sup>, die hier genau nach dem Original mitgeteilt werden soll.

Der Tropfen Blut, dessen Gerinnungszeit bestimmt werden soll, wird in den Hohlsliff eines Objektträgers zu einem dort befindlichen Tropfen Wasser gebracht. Von dem Objektträger, dessen obere Fläche bis zum Hohlsliff hin matt gehalten ist, wird rechts und links soviel abgenommen, daß ein quadratisches Glasstück entsteht. Das Glas soll im Grunde des Hohlsliffes möglichst dünn, jedenfalls nicht über 0,5 mm dick sein.

Es handelt sich nunmehr darum, dieses Glasstück unter konstanter Temperatur von jeweils bestimmter Höhe zu bringen. Zu dem Zwecke kommt es auf einen Konus aus Kupferblech zu liegen, der in Abb. 107 von unten her zu sehen ist. Der Kupferkonus sitzt einer entsprechend gestalteten Hartgummischeibe

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. Bd. 149, S. 318. 1912.

auf, welche Abb. 107 von unten, zum Teil vom Kupferkonus bedeckt, Abb. 106 von oben zeigt. Im Grunde der konischen Vertiefung (Abb. 106) ist aus dem Hartgummi ein viereckiges Stück ausgesägt, so daß dort das Kupferblech sichtbar wird. In den viereckigen Ausschnitt kommt das Glasstück, mit dem Hohlsliff nach oben, auf das Kupferblech zu liegen. Ein viereckiges Hartgummistück mit rundem Ausschnitt kann auf das Glasstück so aufgelegt werden, daß es dieses mit Ausnahme des Hohlsliffes und seiner nächsten Umgebung zudeckt. Über den Hohlsliff wird noch ein Deckel aus Hartgummi gedrückt, dessen Griff in Abb. 105 zu sehen ist. Auf diese Weise ist das Glasstück und damit das im Hohlsliff befindliche verdünnte Blut nach oben und

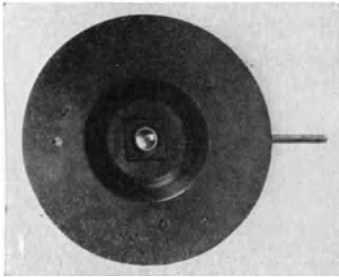


Abb. 106. Hartgummischeibe von oben.

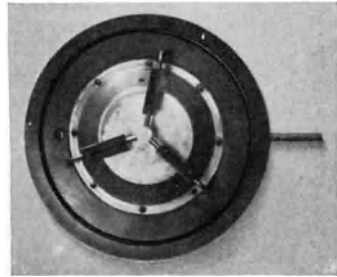


Abb. 107. Hartgummischeibe von unten.

seitlich von schlechten Wärmeleitern umgeben, sitzt aber mit der Unterfläche dem guten Wärmeleiter Kupfer auf.

Der Kupferkonus taucht in Wasser ein, was dadurch erreicht wird, daß die Hartgummischeibe auf den oberen Rand eines mit Wasser gefüllten zylindrischen Gefäßes aus Messing aufgesetzt ist (Abb. 105). Eine Rinne auf der unteren Seite der Hartgummischeibe paßt auf den oberen Rand des Gefäßes. Die Hartgummischeibe kann mit Hilfe eines in allen drei Figuren sichtbaren Griffes auf dem Messinggefäß gedreht werden. Bei der Drehung rühren drei auf der Unterfläche der Hartgummischeibe in einiger Entfernung vom Kupferkonus angebrachte Schaufeln (Abb. 107) das Wasser durch. Das auf drei Füßen ruhende, mit einem Hahne und einer Steigröhre versehene Messinggefäß ist also nach oben durch die Hartgummischeibe und seitlich durch eine ringsum befestigte Filzplatte vor nicht gewünschter Wärmeabfuhr und Wärmezufuhr geschützt. Das Gefäß kann von unten her mit Hilfe eines kleinen beigegebenen Gasbrenners erwärmt und dadurch das

Wasser samt Kupferkonus und Glasstück auf bestimmte Temperatur gebracht und längere Zeit auf dieser Temperatur erhalten werden. Ein Thermometer, durch eine Bohrung der Hartgummischeibe so hindurchgesteckt, daß das Quecksilbergeläß in der Höhe des Bodens des Kupferkonus steht, mißt die Temperatur des Wassers und damit auch annähernd die Temperatur, bei der die Blutgerinnungszeit bestimmt wird.

Zum Apparate gehört noch ein kleiner Erlenmeyer-Kolben samt Pipetten, eine Reihe fein ausgezogener Glasstäbe, das Frankesche etwas modifizierte Instrument zur Blutentziehung und eine in Hartgummi gefaßte Metallspitze zum Herausheben des quadratischen Hartgummi- und Glasstückes. Durch den Stopfen des Erlenmeyer-Kolbens ist eine etwa 15 cm lange, im allgemeinen etwa 5 mm, an der Spitze dagegen nur noch etwa 1 mm weite Pipette hindurchgeführt, welche, mit einem Gummihütchen versehen, zur Übertragung eines Tropfens ausgekochten und wieder abgekühlten destillierten Wassers aus dem Kolben in den Hohlschliff dient; 5 cm von der Spitze entfernt trägt die Pipette eine Marke. Das im Kolben selbst ausgekochte destillierte Wasser ist längere Zeit brauchbar. Statt des Wassers kann auch sterile physiologische Kochsalzlösung oder sterile Ringer-Lockesche Lösung verwendet werden, doch ist das Wasser insofern geeigneter, als in ihm das Auftreten von Fibringerinnseln wegen der eintretenden Hämolyse besser zu sehen ist, und die Gerinnsel selbst durch Quellung voluminöser werden. Ob man Wasser oder die genannten Salzlösungen benutzt und dadurch die roten Blutkörperchen auflöst oder nicht, ist auf die Gerinnungszeit ohne Einfluß. Die etwa 0,5 cm dicken Glasstäbe sollen etwa 18 cm lang und vom 15.—18. cm zu einem Glasfaden, der gegen die Spitze zu 0,3—0,4 mm dick ist, ausgezogen sein. Der Spitze wird dadurch ein Knöpfchen aufgesetzt, daß sie kurze Zeit an den Rand der kleinen leuchtenden Gasflamme des Gasbrenners gehalten wird<sup>1)</sup>. Notwendig ist ferner noch ein feines leinenes Tuch, das möglichst wenig Fäserchen abgibt (am besten ein häufig gewaschenes feines Taschentuch), ein Gemisch von gleichen Volumenteilen chemisch reinen absoluten Alkohols und Narkosenäthers, das man in eine reine Glasflasche mit überragendem Glasstöpsel bringt, und ein zeitmessendes Instrument, eine gewöhnliche Uhr oder noch besser eine Stoppuhr.

---

<sup>1)</sup> Der Apparat samt Zubehör kann vom Universitätsmechaniker E. Albrecht in Tübingen bezogen werden.



Ein Versuch zur Ermittlung der Blutgerinnungszeit wird nun in folgender Weise angestellt.

Das in dem zylindrischen Messinggefäß befindliche Wasser<sup>1)</sup> wird zunächst auf diejenige Temperatur (gewöhnlich 25° C) gebracht, bei welcher die Blutgerinnungszeit ermittelt werden soll, und mit Hilfe des kleinen Gasbrenners, den man je nach Bedarf unterstellt oder wegnimmt, auf dieser Temperatur erhalten, was leicht gelingt, da die Wassermenge etwa 1 l beträgt. Dann wird das Glasstück, insbesondere der Hohlschliff desselben, mit Wasser abgespült, getrocknet und mit dem feinen leinenen Tuche, in das man etwas von dem reinen Äther-Alkohol aufgenommen hat, abgewischt. Etwaige im Hohlschliff zurückbleibende Stäubchen und Fäserchen beseitigt man mit einem feinen Haarpinsel, worauf das Glasstück in den Apparat zurückgebracht und mit dem vier-eckigen Hartgummistück besteckt wird.

Alsdann kommt in die Mitte des Hohlschliffes ein Tropfen des ausgekochten und wieder abgekühlten destillierten Wassers. Zu dem Zwecke saugt man das Wasser mit Hilfe des Gummihütchens aus dem Erlenmeyer-Kolben 5 cm hoch in die Pipette bis zur Marke ein, hält die Pipette mit dem Wasser senkrecht über den Hohlschliff, übt einen gelinden Druck auf das Hütchen aus und läßt dadurch einen Tropfen des Wassers mitten in den Hohlschliff fallen. Darauf legt man den Hartgummideckel auf und wartet, bis der Tropfen Wasser möglichst die Temperatur des im Messinggefäße befindlichen Wassers angenommen hat, was nach etwa 5 Minuten der Fall ist.

Unterdessen wird das Frankesche Instrument zur Blutentziehung<sup>2)</sup> hergerichtet, mit Äther-Alkohol desinfiziert, die Fingerkuppe, aus welcher das Blut am besten entzogen wird, mit Äther-Alkohol gereinigt, der Schnitt, während der Arm etwas abduziert und die Fingerkuppe in Herzhöhe gehalten wird, erzeugt und der erste austretende Blutstropfen nach Abnahme des Deckels in den im Hohlschliff des Glasstückes befindlichen vorgewärmten Wassertropfen eingefallen lassen. Die Blutentziehung muß bei einer Zimmertemperatur von mindestens 17° C geschehen, nur ein Blutstropfen, der rasch und ohne Druck austritt, ist

---

<sup>1)</sup> Man nimmt am besten destilliertes Wasser, um die Ausscheidung von Salzen zu vermeiden.

<sup>2)</sup> Über die bei der Blutentziehung zu beachtenden Momente siehe K. Bürker: Gewinnung, qualitative und quantitative Bestimmung des Hämoglobins. Tigerstedts Handb. d. physiol. Methodik, Bd. 2. Abt. 1, S. 75f., und Zählung und Differenzierung der körperlichen Elemente des Blutes. Tigerstedts Handb. d. physiol. Methodik, Bd. 2, Abt. 5, S. 4f.

brauchbar. Sofort wird der Deckel wieder aufgesetzt, das zeitmessende Instrument in Gang gebracht und die Temperatur am Thermometer abgelesen.

Rasch reinigt man jetzt den Glasfaden eines der fein ausgezogenen Glasstäbe, indem man ihn 1—2 cm tief in den Äther-Alkohol eintaucht und ihn unter rotierender Bewegung zwischen dem mit dem leinenen Tuche bedeckten Daumen und Zeigefinger der anderen Hand hindurchzieht, worauf man auch noch mit dem Knöpfchen das Tuch berührt. Durch Schwenken in der Luft beseitigt man etwaige Reste von Äther-Alkohol.

Nach der ersten halben Minute dreht man die Hartgummischeibe mit Hilfe des Griffes aus der Stellung, wie sie Abb. 105 zeigt, im Sinne des Uhrzeigers um  $45^{\circ}$ , hebt den Deckel ab, geht mit dem Knöpfchen des gereinigten Glasfadens in die Mitte des im Hohl-schliff befindlichen Blutwassertropfens ein und beschreibt, von der Mitte ausgehend bis zur Peripherie des Tropfens, fünf Spiraltouren, um Blut und Wasser zu mischen, ohne aber die Basis des Blutwassertropfens zu vergrößern. Dann wird der Deckel wieder aufgesetzt, der Glasfaden von anhaftendem Blutwasser mit Hilfe des Tuches befreit und wiederum mit Äther-Alkohol in der beschriebenen Weise gereinigt.

Nach der zweiten halben Minute wird die Hartgummischeibe wieder um  $45^{\circ}$  gedreht und darauf mit dem Knöpfchen des Glasfadens etwa 1 mm vom Rande des Blutwassertropfens entfernt in diesen eingegangen, von vorne nach hinten, also vom Untersuchenden weg, in der Richtung eines Durchmessers hindurchgefahren und etwa 1 mm vom jenseitigen Rande entfernt wieder herausgegangen. Nach der dritten halben Minute wird wieder um  $45^{\circ}$  gedreht und mit dem gereinigten Glasfaden in der gleichen Weise und in der gleichen Richtung durchgefahren und das Reinigen, Drehen und Durchfahren nach jeder weiteren halben Minute solange fortgesetzt, bis man das erste Fibrinfädchen aus dem Blutwassertropfen herauszieht, worauf das zeitmessende Instrument arretiert und wiederum die Temperatur notiert wird.

Wenn alles in Ordnung ist, ändert sich die Temperatur unter normalen Verhältnissen während eines Versuches nicht. Bei einiger Übung wird man leicht schon während des Durchfahrens an der Verschiebung des sich bildenden, in dem Blutwasser sichtbaren Gerinnsels den Eintritt der Gerinnung wahrnehmen können. Unter normalen Verhältnissen setzt die Gerinnung, wenn bei  $25^{\circ}$  C untersucht wird, nach 5 Minuten ein, nach  $5\frac{1}{2}$  Minuten soll nicht nur ein Fädchen, sondern ein schon ganz ansehnliches Klümpchen am Glasfaden hängen bleiben.

Unter normalen Verhältnissen ergibt sich als konstante Zeit 5—5½ Minuten für den Beginn der Gerinnung, 12 Minuten für deren Beendigung.

Logarithmentafel (vgl. dazu S. 61).

	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

## Namen- und Sachverzeichnis.

- Abderhalden, Abwehrfermente** 342.  
—, Erepsin-Bestimmung 328.  
**Abeles, Enteiweißung** 194.  
**Ableitungselektrode** 84.  
**Absorptionskoeffizienten für Sauerstoff und CO<sub>2</sub> in Wasser** 137.  
**Abwehrfermente** 342.  
—, Nachweis mit der interferometrischen Methode 344, optischen Methode 343, refraktometrischen Methode 344.  
**Adenase, Darstellung aus Organen nach Schittenhelm** 364.  
**Adenosin, Darstellung nach Levene** 361.  
**Adsorption, auswählende** 3ff., s. a. Aluminiumhydroxyd, Tonerde, Kaolin.  
**Adsorptionswert** 4.  
**Äquivalentleitfähigkeit** 49.  
**Äthylbutyrat, Spaltung durch Leberlipase, Kinetik** 50.  
**Affinitätskonstante der Fermentsubstratverbindung** 58.  
**Agarheber** 87.  
**Aktivatoren** 108.  
**Aktivierung, ausgleichende** — bei der Lipasebestimmung 123, 125.  
— der Amylase mit Kochsalz 176, des Papains mit Blausäure 347.  
**Aktivitäts-*p<sub>h</sub>*-Kurven** 53.  
**Aktivitäts-*p<sub>s</sub>*-Kurve** 54.  
**Allantoin, Darstellung nach Wiechowski** 367.  
**Allantoinase** 367.  
**Alanyl-Glyzin, Darstellung** 327.  
**Albumin zur Pepsinbestimmung** 267.  
**Aldehydzucker, Bestimmung neben Fruktose und Saccharose nach Willstätter-Schudel** 192.  
**Alizarin gelb** 69, 99.  
**Alkohol, Regenerierung** 306.  
**Alkoholische Gärung** 210.  
**Aluminiumhydroxyd s. a. Tonerde.**
- Aluminiumhydroxyd als Adsorbens, Darstellung von A 4,**  
— von B 5,  
— von C 5,  
— von der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Modifikation 6 ff.  
**Aluminiumhydroxyd-Adsorbens für Arginase** 354.  
— — für Erepsin 324.  
— — für Katalase 369.  
— — für Papain 347.  
— — für Pepsin 256.  
— — für Peroxydase 378.  
— — für Trypsin 280, 281.  
**Aluminiumhydroxyd  $\gamma$  zur Trennung von Lipase und Trypsin** 281.  
**Amalgamierung von Platin** 85.  
**Amidasen** 349.  
**Aminosäure-Bestimmung nach Folin (kolorimetrisch)** 339, nach Graßmann und Heyde 310, nach Lindenström-Lang 312, nach van Slyke 294, 302 (manometrisch), nach Sörensen (Formolmethode) 289, nach Willstätter und Mitarbeiter 305 ff. (titrimetrisch).  
**Ammoniak als Eluens** 115.  
—, Entfernung des Ammoniaks bei der van Slyke-Bestimmung 291, 300.  
— -Ammonchlorid-Puffer 123, 126, 307.  
**Ammoniumphosphat - Eluens** 113, 282, 319.  
**Amygdalin, Spaltung durch Emulsin** 173.  
**Amylase** 176.  
—, Bestimmung nach Euler und Svanberg 208, nach Michaelis (Jodmethode) 202, nach Ohlsson (viskosimetrisch) 200, nach Rona und van Eweyk (nephelometrisch) 203, nach

- Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse 206, nach Wohlgemuth (Jodmethode) 201, 202.
- Amylase-Einheit 206, 207.
- , Leber- 179.
- , Pankreas- 177.
- Darstellung nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse 177.
- Reinigung mit Aluminiumhydroxyd 178.
- Trennung von Amylase von Lipase und Trypsin 177.
- , pflanzliche 179.
- Darstellung nach Euler und Svanberg 179.
- Trennung von Maltase 180.
- ,  $p_n$ -Optimum 100.
- , Speichel- 176, 209.
- , Trennung von Lipase und Trypsin 279.
- Amylasewert 208, 209.
- Anoxybiose 240.
- Apozymase 215.
- Arabinose, Tabelle zur Bertrand-Methode 187.
- Arbutin, Spez. Drehung 197.
- Arginase 352.
- , Darstellung von Edlbacher 353.
- , Nachweis und Bestimmung nach Edlbacher und Bonen 354.
- -Einheit 356.
- Arginin, Darstellung nach Kossel und Groß 353.
- Atmungsgröße des Gewebes 250.
- Atoxylfeste Lipase 125.
- Autolyse von Hefe 155, 157, 161.
- Autolyse, Gewebs-, Nachweis nach Rona und Mislowitz 332, nach Salkowski 332.
- Azetaldehyd bei der alkoholischen Gärung 210.
- -Bestimmung 227, 228, 230.
- -Reaktionen 227, 231.
- Azetatpuffer 132.
- Azetat-Standard 89.
- Azetondauerhefe nach Buchner 211.
- Azidalbuminlösung nach Sörensen zur Pepsinbestimmung 264.
- Azidität und Fermentumsatz 53.
- Azolithmin 68.
- Bach, Tyrosinase-Bestimmung 372.
- Bamann und Schmeller, Titrimetrische Lipasebestimmung 128.
- Bang, Mikro-Stickstoff-Bestimmung 334.
- Barcroft-Manometer 71, 132, 220, 239.
- Barfoedsches Reagens 203.
- Battelli und Stern, Darstellung der Leberkatalase 368.
- — —, Darstellung und Nachweis der Urikase 366.
- Benzopurpurin 68.
- Benzoessäure aus Hippursäure durch Histozyim 351.
- Bernsteinsäure als Wasserstoffdonator 382.
- Bertrand, Darstellung von Laktase 377.
- Bertrandsche Methode der Zuckerbestimmung 180.
- Bestimmung des Amino-N nach van Slyke 294, 302.
- der Aminosäuren nach Willstätter und Mitarbeiter 305ff.
- , Aminosäure- nach Linderström-Lang 312, nach Folin (kolorimetrisch) 339.
- der Amylase nach Euler und Svanberg 208, nach Michaelis 202, nach Ohlsson 200, nach Rona und van Eweyk 203, nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse 206, nach Wohlgemuth 201.
- der Arginase nach Edlbacher und Bonen 354.
- der Autolyse nach Rona u. Mislowitz 332, nach Salkowski 332.
- von Azetaldehyd (nach Neuberg) mit Bisulfit 227, 230, mit Hydroxylaminsulfat 230.
- von Blausäure nach Brunswik 198.
- der Dehydrasen nach Thunberg 381.
- der Dioxyphenylaminopropionsäure neben Tyrosin 375.
- des Emulsins nach Brunswik 197, nach Helferich 196, nach Josephson 197, nach Willstätter und Csányi 194.

- Bestimmung von Enterokinase nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz 322.
- von Erepsin nach Abderhalden (optisch) 328, nach Salaskin 326, nach Waldschmidt-Leitz 326.
- der fettspaltenden Fermente 119.
- von Fibrinogen nach Starlinger 386.
- der Gefäßkonstante in der Warburg-Apparatur 138.
- der Gerinnungszeit nach Bürker 396, nach Fuld 390, nach Frisch und Starlinger 392, nach Heubner und Rona 391, nach Wöhlisch 393, nach Wöhlisch und Pieritz 395.
- der Glykolyse 232, im Gewebe (nach Warburg) 237.
- der Harnsäure in Organen nach His und Hagen 365.
- der Hefegärung nach Buchner (gravimetrisch) 217, nach Euler und Josephson 220, nach Harden, Thompson und Young 219, nach Warburg, Dörner und Meyerhof 220, gasvolumetrisch nach Willstätter und Steibelt 217.
- des Histozyms nach Smorodinzew 351.
- der Katalase nach Hennichs 369, nach Morgulis 370, nach Tsuchihashi 370.
- der Labwirkung nach Michaelis und Rothstein 275, nach Rona und Gabbe 277.
- der Laktase nach Willstätter und Oppenheimer 199.
- der Leberamylase nach Holmbergh 209.
- der Lipase, elektrotitrimetrisch nach Rona-Michaelis 129, gasanalytisch (Rona und Lasnitzki) 132, stalagmometrisch nach Rona und Michaelis 119, nach Willstätter-Memmen 124, titrimetrisch nach Bamann und Schneller 128, nach Knaffl-Lenz 127, nach Willstätter 125, der Rizinuslipase nach Willstätter-Waldschmidt-Leitz 131.
- Bestimmung von Maltase nach Kusumoto 194, nach Willstätter, Oppenheimer und Steibelt 193.
- der Milchsäure nach Embden und Meyerhof, Fürth-Charnas, Ripper, Modifikation nach Hirsch-Kauffmann 232, 233.
- der Nukleosidase nach Euler u. Brunius 361, nach Levene 358.
- der Nukleotidase nach Deutsch 363.
- des Papains 347.
- des Pepsins nach Ege 260, nach Fuld-Levison 259, nach Groß 263, nach Grützner 258, nach Holster 267, nach Jakob 261, nach Michaelis-Rothstein 262, nach Rona-Kleinmann 265, nach Sörensen 264, nach Sörensen, Katschioni-Walther und Linderström-Lang 268, nach Volhard-Löhlein 258, nach Willstätter 269.
- der Peptidspaltung nach der Formoltitration 289, nach Abderhalden (optisch) 329, nach Krebs und Donegan (manometrisch) 329, (titrimetrisch) nach Linderström-Lang 312, nach Willstätter 305, nach van Slyke (gasanalytisch) 294.
- von Peroxydase nach Willstätter und Stoll 379, nach Willstätter und Weber 380.
- der Phosphatase 145.
- des Phosphors nach Embden 150, nach Kuttner und Cohen 145, nach Lieb 146.
- der Speichelamylase nach Pringsheim und Gorodiski 209.
- der Sulfatase nach Neuberg 154.
- , Stickstoff- nach Bang (Mikro-) 334, nach Folin 336.
- von Thrombin nach Wohlgemuth 389.
- des Trypsins von Fermi (modif. von Palitzsch und Walbum) 285, nach Groß-Fuld (modif. von Michaelis) 284, von Northrop 286, titrimetrisch nach Willstätter 305, nach Willstätter und Waldschmidt-

- Leitz 307, nach Willstätter und Persiel 308, nach Willstätter, Dunaiturria u. Künstler 311.
- Bestimmung des Trypsins, nephelometrisch (Rona-Kleinmann) 314.
- der Tyrosinase nach Bach 372, nach Haehn und Stern 374, nach Raper und Wormall 373.
- der Urease nach Euler und Brunius 351, nach Lövgren 349.
- der Verseifungszahl 127.
- des Zuckers nach Bertrand 180, nach Hagedorn-Jensen 189, nach Moeckel und Frank 183, nach Michaelis 184, polarimetrisch 192, nach Willstätter-Schudel 191.
- Bezugselektrode 72, 84.
- Birnen-Elektrode 86.
- Bimolekulare Reaktion 50.
- Biuret-Reaktion 325, 343.
- Blausäure, Aktivator des Papains 346.
- Bestimmung nach Brunswik 198.
- , Wirkung auf Glykolyse 243.
- , — auf Katalase 370.
- Bleibtreu und Atzler (Tsunoo), Thrombingerinnung 388.
- Blut, Bestimmung der Milchsäure im 232.
- , Enteiweißung 337 ff.
- , Glykolyse im 244, 252.
- Blutentnahme 399.
- zur Plasmagewinnung 384, 385.
- Blutgerinnungs-Fermente 384.
- Blutkatalase, Darstellung nach Tsuchihashi 367.
- Blutserum, chinin- und atoxylfeste Lipase im 125.
- zur Pepsinbestimmung 265.
- Bourquelot, Hérissé und Bridel, fermentative Synthese von Glukosiden 174.
- Borat-Puffer 65.
- Boysen Jensen, Darstellung des Co-Enzyms 215.
- —, — von cozymasefreier Hefe 216.
- Brenztraubensäure 210, 226.
- Brodiesche Flüssigkeit 133.
- Bromkresolpurpur bei der Bestimmung von Leberesterasen 129.
- Bromkresolrot 69.
- Bromphenolblau 69.
- Bromthymolblau 66.
- Brunswik, Bestimmung des Emulsins 197.
- Buchner, Bestimmung der Hefegärung 217.
- , Darstellung von Hefepreßsaft 210.
- , — von Azetondauerhefe 211.
- Bürker, Kolorimeter nach 42.
- , Gerinnungszeit-Bestimmung 396.
- Buttersäure-isoamylester, Bildung der — durch Pankreasesterase 143.
- Butyraseeinheit 124.
- Chinhydron, Reinigung 92.
- Chinhydronelektrode 90.
- , Mikro- nach Ettisch 93, nach Michaelis 93.
- Chinidin, Trübungsreagens für die nephelometrische Trypsinbestimmung 314.
- Chininfeste Lipase 125.
- Chlorammon-Ammoniak-Puffer 62.
- Chloroform als Konservierungsmittel 20.
- Chloroformwasser 332.
- Cholesterin als Adsorbens von Lipase 114.
- Chymosin s. Lab.
- $p_H$ -Optimum 108.
- Clark-Element 98.
- Clark und Lubs, Indikatoren 69.
- — —, Puffermischung 65.
- Co-Enzym 213.
- — —, Darstellung aus Hefekochsaft nach Boysen Jensen 215, nach Euler und Karlsson 214, aus Muskelkochsaft nach Meyerhof 215.
- — —,  $p_H$ -Optimum 108.
- — —, Reinigung 214.
- Cohnheim, Darstellung und Nachweis des Erepsins 323, 325.
- Co-Zymase s. a. Co-Enzym.
- — —, Messung der Wirkung nach Euler und Karlsson 217.
- — —, Prüfung auf Abwesenheit von 216.
- Darmlipase, Darstellung nach Ham-sik 118.
- Darmpulver zur Kinasedarstellung 318.

- Darstellung von Adenase und Guanase nach Schittenhelm 364.
- von Adenosin nach Levene 361.
- des Allantoin nach Wiechowski 367.
- von Aluminiumhydroxyd 4ff.
- der Arginase nach Edlbacher 353.
- des Arginins nach Kossel und Groß 353.
- der Blutkatalase nach Tsuchihashi 367.
- der Leberkatalase nach Battelli Stern und Hennichs 368.
- des Co-Enzyms nach Boysen Jensen 215, nach Euler-Karlsson 214, nach Meyerhof 215.
- von Dehydrasenlösung 383.
- von Emulsin nach Helferich 173, nach Willstätter und Csányi 172.
- der Enterokinase nach Waldschmidt-Leitz 318.
- von enterokinasefreiem Trypsin nach Waldschmidt-Leitz und Linderström-Lang 320.
- von cozymasefreier Hefe nach Boysen Jensen 216, nach Euler und Myrbäck 216.
- des Erepins nach Cohnheim 323, nach Raubitschek 323, nach Waldschmidt-Leitz 323, 324.
- von Gelatinelösung nach Loeb 286.
- von  $\alpha$ -Glukosidase 174.
- von Azetondauerhefe nach Buchner 21.
- von Hefepreßsaft nach Buchner 210.
- der Dipeptidase nach Graßmann 282.
- des Hefetrypsins nach Willstätter 282.
- von Hexosedi- und Monophosphat nach Harden 222, nach Neuberg und Kobel, Neuberg und Sabetay, Neuberg und Leibowitz 222, 223.
- der Hexosemonophosphorsäure nach Neuberg 225.
- des Histozyms nach Smorodinzew 351.
- Darstellung von Jodlösung 0,1n 232.
- von Kaliumbisulfidlösung 0,1n 233.
- von Kalziumsulfid 228.
- von Lab nach Hammarsten 273, nach Wohlgemuth 272.
- —, Bestimmung nach Michaelis-Rothstein 275.
- von Laktase nach E. Fischer und Willstätter-Oppenheimer 175.
- von Lakkase nach Bertrand 377.
- der Leberamylase nach Holmbergh 179.
- von Alanyl-Glyzin 327, von Glyzyl-Glyzin 328, von Leuzyl-Glyzin 326.
- von Lipasen, Leberlipase 115, Magenlipase 117, Pankreaslipase 111, Rizinuslipase 118, Serumlipase 118.
- der Maltase nach Willstätter 169, nach Willstätter, Baumann 170.
- der Nukleasen 357.
- der Nukleosidase nach Levene 358, nach Tannhauser und Ottenstein 360.
- von Pankreasamylase nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse 177.
- von Pankreaspulver nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz 278.
- von Pepsin nach Forbes 255, nach Hammarsten 254, nach Marston 256, nach Pekelharing 253.
- von Peroxydase nach Willstätter und Stoll 378.
- von Ribopolynukleotidase nach Jones 359.
- von Saccharase aus Hefe 155ff., nach Euler und Josephson 158, nach Hudson 157, nach Willstätter u. Mitarbeiter 159.
- der Salizylase nach Jakob 377.
- der Speichelamylase nach von Pringsheim und Gordiski 176.
- der Sulfatase nach Neuberg 153.
- von Thrombokinase nach Morawitz 389.



- Darstellung von Trockenhefe und Hefesaft nach v. Lebedew 212.  
 — des Trypsins nach Michaelis 273, nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz 278, 282.  
 — der Urease nach Jakoby und Sugga 349.  
 — der Urikase nach Battelli und Stern 366, nach Schittenhelm 366.  
 Dehydrasen 381.  
 —, Bestimmung der — mit der Methylenblaumethode von Thunberg 381.  
 —, Herstellung 383.  
 Desamidierende Fermente 364.  
 Deutsch, Bestimmung der Nukleotidase 363.  
 Diäthylbarbitursäure (Veronal) als Puffer nach Michaelis 66.  
 Dialyse, Reinigung der Fermente durch 8, nach Sörensen 216.  
 —, Elektrodialyse 15, nach Freundlich und Loeb 16, nach Pauli 15, nach Baer 17.  
 Dialysemembran 17.  
 — aus Kollodium 9.  
 —, Prüfung der Durchgängigkeit 9, 12, 13.  
 Diastase s. Amylase.  
 —, Bestimmung im Harn nach Wohlgemuth 202.  
 —, Taka- 180.  
 Dilatometrie 43.  
 Dimethylgelb (Dimethylaminoazobenzol) 68.  
 Dinatriumsulfit, Gäransatz mit 228.  
 Dinitrophenol- $\beta$ , - $\gamma$  69.  
 Dioxyphenylaminopropionsäure, Bestimmung neben Tyrosin nach Schmalfuß und Lindemann 375.  
 Dipeptidase, Darstellung nach Graßmann 282.  
 Dissoziationskonstante der Ferment-Substrat-Verbindung 58.  
 Dopa-Oxydase 375.  
 — — aus *Tenebrio molitor* 376.  
 Dörrmalz zur Darstellung von Amylase 179.  
 Drehungsvermögen, spezifisches 26.  
 —, molekulares 27.  
 Duboscq-Kolorimeter 41.  
 Edestin zur Pepsinbestimmung 259, 260.  
 Ege, Pepsin-Bestimmung 260.  
 Einheit, Amylase- 206, 207.  
 —, Arginase- 356.  
 —, Enterokinase- 322.  
 —, Erepsin- 328.  
 —, der Gärwirkung 226.  
 —, Lipase- 124, 127, 132.  
 —, Maltose- 170.  
 —, Nukleotidase- 363.  
 —, Peroxydase- 380.  
 —, Saccharase- 169.  
 —, Trypsin- 309, 311, 312.  
 Eintauchfilter nach Giemsa 14.  
 Eintauch-Refraktometer von Pulfrich 28.  
 — —, Umrechnungstabelle 30.  
 Eisenhydroxyd, kolloidal zur Enteiweißung nach Rona und Michaelis 338.  
 Eiweißfällung mit Gerbsäure 264.  
 — mit Zinnchlorür 264.  
 — s. a. Enteiweißung.  
 Eiweißspaltende Fermente 253.  
 — —, Systematik 253.  
 Elektroden 84.  
 —, Kalomel- 72.  
 —, Platin-Wasserstoff- 72.  
 Elektrodialysierapparat nach Baer (Mikro-) 17, nach Freundlich und Farmer Loeb 16, nach Pauli 15.  
 Elektrometer, Kapillar- 76.  
 Elektrometrische Messung der Wasserstoffionenkonzentration 71.  
 Elektronenröhre 94.  
 Elektrotitrimetrische Bestimmung der Lipase 129.  
 Elution, auswählende 3ff.  
 —, — vgl. auch Ammoniak, Ammonphosphatlösung.  
 Embden, Bestimmung der Milchsäure 233.  
 —, Phosphor-Bestimmung 150.  
 Emulsin, Bestimmung nach Brunswik 197, nach Helferich 196, nach Josephson 197, nach Willstätter und Csányi 194.  
 —, Darstellung von Helferich 173, von Willstätter und Csányi 171.  
 —,  $p_H$ -Optimum 174, 199.  
 —, Zeitwert 173.

- Enteiweißung nach Abeles 194, nach Schenck 336.  
 — mit kolloidalem Eisenhydroxyd nach Rona und Michaelis 183, 184, 338.  
 — mit Kaolin nach Michaelis und Rona 338.  
 — mit Natriumwolframat nach Folin-Wu 337, 365.  
 — mit Trichloressigsäure 337.  
 — mit Zinkhydroxyd 189.  
 — s. a. Eiweißfällung.  
 Enterokinase 309.  
 —, Bestimmung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz 322.  
 —, Darstellung nach Waldschmidt-Leitz 318.  
 —, — von erepsinfreier — nach Waldschmidt-Leitz 321.  
 —, Einheit 322.  
 —, Trennung von Kinase 319.  
 —, — von Trypsin 317.  
 Entfärbung dunkler Lösungen (bei der Formoltitration) 291.  
 Entzuckerung nach Salkowski 234.  
 Enzym s. Ferment.  
 — -Einheit 51.  
 — -Wert 59.  
 Erdtman, Phosphatase-Darstellung 144.  
 Erepsin, Bestimmung nach Abderhalden (optisch) 328, nach Salaskin 326, nach Waldschmidt-Leitz 326.  
 —, Darstellung nach Cohnheim 323, nach Raubitschek 323, nach Waldschmidt-Leitz 323, 324.  
 —, Einheit 328.  
 — -Nachweis nach Cohnheim 325.  
 —,  $p_n$ -Optimum 106.  
 —, Trennung von Hefe-Trypsin 282, 324 (nach Waldschmidt-Leitz).  
 Essigsäure-Azetat-Puffer 62.  
 Esterase 111  
 — s. a. Lipase.  
 — -Bestimmung, elektro-titrimetrisch 129, gasanalytisch 132, stalagmetrisch 119, titrimetrisch 125.  
 —, Leberesterase 115.  
 —, synthetische Wirkung 143.  
 —, Taka- 142.  
 Ester-Synthese, fermentative 142.  
 Euler und Svanberg, Amylase-(Malz-)Bestimmung 208.  
 — und Karlsson, Darstellung des Co-Enzyms 214.  
 — und Myrbäck, Darstellung von co-zytnasefreier Hefe 216.  
 — und Josephson, Bestimmung der Hefegärung 220.  
 — und Brunius, Bestimmung der Nukleosidase 361.  
 — und Josephson, Darstellung von Saccharase 158.  
 — und Brunius, Bestimmung der Urease 351.  
 Extraktion von Fermenten 1, 2.  
 Extraktionshülsen von Schleicher und Schüll 9.  
 Faust-Heimscher Trockenapparat 2.  
 Ferment, Darstellung, Allgemeine Vorschriften 1, Einheiten 59.  
 —, Masse 59.  
 Fermentative Synthese von Estern 142, von Glukosiden 174.  
 Ferment-Substrat-Verbindung, Dissoziations-(Affinitäts-)konstante der 58.  
 Fermi, Trypsin-Bestimmung 285.  
 Fettspaltende Fermente 111.  
 Fibrin zur Pepsinbestimmung nach Grützner 258.  
 Fibrinogen, Bestimmung nach Starlinger 386.  
 —, Gewinnung nach Hammarsten und Nolf 385.  
 Filter, Eintauch- (nach Giemsa) 14.  
 —, Geräte und -Vorrichtungen (nach Bechhold-König, der Firma Schott) 15.  
 Filterröhrchen nach Pregl 148.  
 Fischblasen 9.  
 Flüssigkeitswiderstand 19.  
 Folin, Aminosäurenstickstoff-Bestimmung (kolorimetrisch) 339.  
 —, Stickstoff-Bestimmung 336.  
 — und Wu, Enteiweißung mit Natriumwolframat 337.  
 Forbes, Darstellung von Pepsin 255.  
 Formollösung für die Formoltitration 290, 292.  
 Formoltitration nach Sörensen 289.  
 — zur Pepsinbestimmung 268.

- Forrai, Phosphatase-Darstellung 145.
- Freundlich und Farmer Loeb, Elektrodialyse nach 16.
- Frisch und Starlinger, Gerinnungszeit-Bestimmung 392.
- Fruchtzucker s. Fruktose.
- , spez. Drehung 28.
- Fuld, Gerinnungszeit-Bestimmung 390.
- Levison, Pepsin-Bestimmung 259.
- Fürth-Charnas, Milchsäure-Bestimmung im Muskelgewebe 232.
- Galaktose, spez. Drehung 28.
- , Tabelle zur Bertrand-Methode 187.
- Galvanometer als Nullinstrument 77.
- Gärung, alkoholische, s. a. Hefegärung 210.
- Gäransatz mit Sulfit nach Neuberg 228.
- Gärführung 161.
- Gärröhrchen 217.
- Gärschema von Neuberg 210.
- Gärung, zellfreie, Pufferung mit Brenztraubensäure-Kaliumphosphat 226.
- Gärwirkung, Maßeinheit 226.
- Gasanalytische Bestimmung der Lipasewirkung 132, der Peptidspaltung 302, 329.
- Gefäßkonstante in der Warburg-Apparatur 137ff.
- Gefrieren von Organen zur Fermentgewinnung 2.
- Gelatine-Gelbfilter 22.
- Gelatinelösung nach Loeb 286.
- zur Pepsinbestimmung 268.
- zur Trypsinbestimmung nach Palitzsch und Walbum 285, Spaltung mit Trypsin 308, 311.
- Gelatinemembran, chromiert für Elektrodialyse 17, 18.
- Geometrische Reihen 20, 21.
- Gerbsäurelösung zur Fällung von Eiweiß 264, 272.
- Gerinnungs-Hinderung durch Oxalat, Fluorid, Zitrat 386.
- Gerinnungszeit, Bestimmung nach Bürker 396, nach Frisch und Starlinger 392, nach Fuld 390, nach Heubner und Rona 391, nach Wöhlisch 393, nach Wöhlisch und Pieritz 395.
- Gewebe, Atmungsgröße 250.
- , Glykolyse 237, 250.
- Gewebsschnitte zur Bestimmung der Glykolyse 238.
- Glas-Filtergerät (Schott) 15.
- Gliadinlösung zur Pepsinbestimmung 268.
- Glocken-Elektrode 88.
- Glukose s. a. Zucker, Traubenzucker.
- , Bestimmung neben Maltose 203.
- , Tabelle zur Bertrandmethode 182, 184, 186.
- Glukoside, fermentative Synthese von 174.
- , spez. Drehung 197.
- $\alpha$ -Glukosidase 174.
- $\beta$ -Glukosidase 174.
- , Trennung von Mandel-Amylase 174.
- Glykogenlösung zur nephelometrischen Amylase-Bestimmung 204.
- Glykokoll-Standard - Lösung nach Sörensen 63.
- Glykolyse 232.
- , Bestimmung nach Warburg 237.
- unter aeroben Bedingungen 238, 240.
- unter anaeroben Bedingungen 240.
- , Wirkung der Blausäure auf 243.
- im Blut 244.
- Glukose s. Glukose.
- Glyzerin als Extraktionsmittel 2.
- Glyzerophosphatase 152.
- Glyzyl-Glyzin, Darstellung 328.
- , Spaltung durch Erepsin, Kinetik 51.
- Graßmann, Darstellung der Dipeptidase 282.
- und Heyde, Mikro-Bestimmung der Aminosäuren und Polypeptide 310.
- Groß, Pepsin-Bestimmung 263.
- und Fuld, Trypsin-Bestimmung 284.
- Grützner, Pepsin-Bestimmung 258.
- Guanase 364.
- , Darstellung aus Organen nach Schittenhelm 364.
- Günzburgsche Reaktion 270.

- [H] s. Wasserstoffionenkonzentration (Wasserstoffzahl).  
 $h$  = Wasserstoffzahl 61.  
 Haehn und Stern, Tyrosinase-Bestimmung 374.  
 Hagedorn-Jensen, Zuckerbestimmung 189.  
 Hahnfett 296.  
 Halbgärzeit 226.  
 Halbschattenpolarimeter 24.  
 Hammarsten, Darstellung von Lab 273.  
 —, — von Pepsin 254.  
 — und Nolf, Fibrinogenlösung-Gewinnung 385.  
 Harden, Darstellung von Hexose, di- und monophosphat 222.  
 —, Thompson und Young, Bestimmung der Hefegärung 219.  
 Harn, Pepsinnachweis im 271.  
 — -Distase (Amylase), Bestimmung nach Wohlgemuth 202.  
 Harnsäure, Bestimmung in Organen nach His und Hagen 365.  
 —, Nachweis in den Geweben nach Steudel und Suzuki 365.  
 Harnsäureoxydase s. Urikase.  
 Hedin, Pepsin-Nachweis im Harn 271.  
 Hefe, Co-zymasefreie 215.  
 — -Autolyse 155, 161, 164.  
 —, Darstellung von Boysen Jensen 216, von Euler und Myrbäck 216.  
 —, Dauer- (Azeton) nach Buchner 211.  
 —, Nährstoffe für 218.  
 —, Preßsaft nach Buchner 210.  
 —, Saft nach Lebedew 212.  
 —, Trocken- von Lebedew 212.  
 —, untergärige, zur Darstellung von Saccharase 158.  
 Hefegärung, Bestimmung, gravimetrisch nach Buchner 217, gasvolumetrisch nach Euler und Josephson 220, nach Harden, Thompson und Young 219, nach Warburg-Dorner und Meyerhof 220, nach Willstätter und Steibelt 217.  
 —,  $p_h$ -Optimum 213.  
 Hefe-Nukleinsäure, Darstellung von Adenosin aus Hefe-Nukleinsäure 362.  
 Hefepreßsaft, Darstellung nach Buchner 210.  
 Hefetrypsin, Darstellung nach Willstätter 282.  
 Helferich, Darstellung und Bestimmung von Emulsion 173, 196.  
 Helizin, spez. Drehung 197.  
 Hennichs, Darstellung und Bestimmung der Katalase 368, 369.  
 Hepato-Nukleotidase s. Nukleotidase.  
 Heubner und Rona, Gerinnungszeit-Bestimmung 391.  
 Hexosephosphorsäure, Salze 222.  
 — —, Hexosediphosphat, Darstellung nach Harden 222, nach Neuberg und Kobel 222, nach Neuberg und Sabetay 223.  
 — —, Hexosemonophosphat, Darstellung nach Neuberg, Neuberg und Leibowitz 224, 225.  
 Hippursäure, Spaltung durch Histozyzm 351.  
 Hirsch, interferometrischer Nachweis der Abwehrfermente 344.  
 — -Kauffmann, Milchsäure-Bestimmung 232, 233.  
 Hirudinplasma 387.  
 His und Hagen, Bestimmung der Harnsäure in den Organen 365.  
 Histozyzm 351.  
 —, Darstellung und Bestimmung nach Smorodinzew 351.  
 Holmbergh, Darstellung und Bestimmung der Leberamylase 179, 209.  
 Holster, Pepsin-Bestimmung 267.  
 Howell, Thrombingerinnung 387.  
 Hudson, Darstellung von Saccharase 157.  
 Hydrolysenkonstanten (relative) der Fermentsubstratverbindung 58.  
 Hypoxanthin 364.  
 Indikatoren 67ff.  
 Indikatorenmethode nach Michaelis 69.  
 Induktionsperiode der Gärung 213.  
 Ionenstärke (ionale Konzentration) Interferometrie 34. [67.  
 Invertin 155.  
 — s. a. Saccharase.  
 Invertzucker, Tabelle zur Bertrandmethode 186.

- Inversionsfähigkeit der Saccharase 167.
- Jakoby**, Pepsin-Bestimmung 261.  
 —, Salizylase-Darstellung 377.  
 — und Sugga, Darstellung der Urease 349.
- Jodfärbung der Stärke 203.  
 Jodlösung 0,1 n, Darstellung von — 232.
- Jodmethoden zur Amylase-Bestimmung (Wohlgemuth 201, Michaelis 202).
- Jones**, Darstellung von Ribopolynukleotidase 359.
- Josephson**, Bestimmung des Emulsins nach 173, 197.
- Kadmium-Element** 76.
- Kaliumbiphthalat, Darstellung 65.
- Kaliumbisulfidlösung, Darstellung 233.
- Kaliumchlorid-Lösungen, spezifische Leitfähigkeit von 49.
- Kaliumhydroxydlösung 0.1 n, alkoholische 269.
- Kalomel für die Kalomel-Elektrode 85.
- Kalomel-Elektrode 72, 84, 85 (gesättigt).  
 — —, Eichung 89.
- Kalziumhexosediphosphat 222.
- Kalziumphosphat, dreibasisch als Adsorbens für Katalase 368.
- Kalziumsulfid, Abfangen von Azetaldehyd 227.  
 —, Darstellung 228.  
 —, Gäransatz mit — 228.
- Kandiolin (Hexosediphosphorsaures Kalzium) 223.
- Kaolin als Adsorbens 4.  
 —, säuregereinigtes 7.  
 —, Adsorbens für Arginase 354.  
 — — für Erepsin 325.  
 — — für Katalase 369.  
 — — für Lipase 114, 115.  
 — — für Maltase 170.  
 — — für Peroxydase 378.  
 — — für Saccharase 159, 160, 162.  
 — — für Trypsin 280.  
 — zur Enteiweißung nach Michaelis und Rona 338.  
 —, Verhalten gegen Amylase 280.
- Kapazität, Widerstands-, des Leitfähigkeitsgefäßes 48.
- Kapillar-Elektrometer 76ff.
- Karboxylase 226.  
 —, Demonstration der Karboxylase-wirkung nach Neuberg 227.
- Karminlösung zum Färben des Fibrins 258.
- Kartoffelschalen zur Herstellung von Tyrosinase 372, 374.
- Kasein, Adsorption von Thrombin 388.  
 — zur Pepsinbestimmung nach Groß 259, 263, nach Volhard 268, 272.  
 — zur Trypsinbestimmung 284, 312, 314.
- Katalase 367.  
 — s. a. Blutkatalase, Leberkatalase.  
 — Bestimmung nach Hennichs 369, nach Morgulis 370, nach Tsuchihashi 370.  
 —,  $p_H$ -Optimum 108.
- Kathepsin 253.
- Kohlensäure, Absorptionskoeffizient in Wasser 137.
- Kinase s. Enterokinase.
- Kinetische Messung der Fermentwirkung 49.
- Knaffl-Lenz, Titrimetrische Lipasebestimmung 127.
- Koagulometer nach Heubner und Rona 391.
- Kochsalz als Aktivator für Amylase 176.
- Kohlehydrate, Reaktion auf — nach Molisch 234.
- Kohlehydratspaltende Fermente 155.
- Kollodium-Lösung 11, 13.  
 — — zur Darstellung von Dialysiermembranen nach Michaelis 9, nach Ostwald 9, nach Trendelenburg 10.
- Kolorimeter nach Duboscq 41.
- Kolorimetrie 40.
- Kompensationsschaltung nach Pogendorf 74.
- Konduktometrie 45.
- Konservierung der Fermente 19.
- Kossel und Groß, Darstellung des Arginins 353.
- Kraut und Bauer, Darstellung von Papain 347.
- Krebs und Donegan, Manometrische Bestimmung der Peptidsplaltung 329.

- Kresolphthalein 69.  
 Kresolrot 69.  
 Kuhn, Phosphorbestimmung 150.  
 Kusumoto, Bestimmung der Mal-  
 tase nach 194.  
 Kuttner und Cohen, Phosphor-  
 Bestimmung 145.  
  
 Lab, Bestimmung nach Rona und  
 Gabbe 277.  
 —, Darstellung nach Hammarsten  
 273, nach Wohlgemuth 272.  
 Lackmoid 68.  
 Lakkase, Darstellung aus *Russula*  
*delica* nach Bertrand 377.  
 Laktase, Bestimmung nach Will-  
 stätter und Oppenheimer  
 199.  
 —, Darstellung nach Fischer 175,  
 nach Willstätter, Oppenhei-  
 mer 175.  
 —,  $p_H$ -Optimum 104.  
 —, Zeitwert 176.  
 Laktose s. a. Milchzucker.  
 —, Kupferzahlen im Glukose- +  
 Galaktosegemisch 199.  
 —, Spaltung durch Emulsin 173.  
 —, Tabelle zur Bertrand-Methode  
 188.  
 Lampe bei der Polarimetrie nach  
 Airila und Komppa 22.  
 Latapie, Organzerkleinerung mit 1.  
 Lebedew, Darstellung von Trocken-  
 hefe und von Hefesaft 212.  
 Leberamylase, Darstellung und Be-  
 stimmung nach Holmbergh  
 179, 209.  
 Leberbrei, Bestimmung des Azet-  
 aldehyds in 230.  
 Leberesterase 115.  
 —, Darstellung nach Knaffl-Lenz  
 116, nach Willstätter-Mem-  
 men 115.  
 —, Methylbutyratspaltung durch  
 129.  
 Leberkatalase, Darstellung nach  
 Battelli und Stern und Hen-  
 nicks 368.  
 Leberlipase, Darstellung nach Will-  
 stätter und Memmen 115.  
 Leitfähigkeit, Äquivalent- 49.  
 —, Messung 45.  
 Leitfähigkeitsgefäß nach Northrop  
 288.  
  
 Leitfähigkeitsmethode zur Trypsin-  
 Bestimmung nach Northrop  
 286.  
 Leitfähigkeit, spezifische 48.  
 Leuzylglyzin, Darstellung 326.  
 Levene, Adenosin-Darstellung 361.  
 —, Darstellung und Bestimmung der  
 Nukleosidase 358.  
 Lichtquelle bei der Polarimetrie 22.  
 Lieb, Phosphor-Bestimmung 146.  
 Linderström-Lang, Aminosäure-  
 Bestimmung 312.  
 — — —, Methode zur Pepsinbestim-  
 mung 269.  
 Lipase 111.  
 — s. a. Esterase.  
 —, Bestimmung elektrotitrimetrisch  
 nach Rona und Ammon 129.  
 — -Bestimmung in der Milch 125.  
 —, Bestimmung 119ff., titrimetrisch  
 nach Knaffl-Lenz 127, nach  
 Willstätter 125 (Modifikation  
 nach Bamann und Schmeller  
 128).  
 —, chinin- und atoxylfeste — 125.  
 — -Einheit 124, 126.  
 —, Magenlipase 117.  
 —, Darmlipase 118.  
 —,  $p_H$ -Optimum 100.  
 —, Rizinuslipase 118, Bestimmung  
 131.  
 —, Serumlipase 118.  
 —, Trennung von Amylase und  
 Trypsin 279.  
 —, — von Pankreasamylase 177.  
 Lipasewert 127.  
 Loeb, Herstellung einer Gelatine-  
 lösung 286.  
 Lövgren, Bestimmung der Urease  
 350.  
  
 Magenlipase, 117.  
 —, Darstellung nach Willstätter,  
 Haurowitz, Memmen 117.  
 Magensaft, künstlicher 256.  
 —, Pepsinbestimmung im 258, 260,  
 262, 263, 270.  
 Magenschleimhaut zur Darstellung  
 von Pepsin 253, 254ff.  
 Magnesiumhexosodiphosphat 224.  
 Malachitgrün zur Bestimmung der  
 Peroxydase 380.  
 Malachitgrünzahl 381.

- Maltase, Adsorption durch Kaolin, durch Tonerde 170.  
 —, Bestimmung nach Kusumoto 194, nach Willstätter, Oppenheimer und Steibelt 193.  
 — im Blutserum und in der Leber 194.  
 —, Darstellung nach Willstätter, Oppenheimer, Steibelt 169, nach Willstätter, Bamann 170.  
 — -Einheit 170.  
 —,  $p_H$ -Optimum 102.  
 —, Trennung von Saccharase 171.  
 —, Zeitwert 170.  
 Maltose, Spez. Drehung 28, 194.  
 —, Optisches Verhalten bei der Spaltung 194, 195.  
 —, Tabelle zur Bertrand-Methode 188.  
 Malzamylyase 180.  
 —, Bestimmung nach Euler und Svanberg 208.  
 Mandelsäuremethylester, Darstellung 143.  
 —, Spaltung durch Taka-Esterase 142.  
 Mannose, Tabelle zur Bertrand-Methode 187.  
 Manometer nach Barcroft 132.  
 Marston, Darstellung von Pepsin 256.  
 Meerrettich zur Peroxydase-Darstellung 378.  
 Mehlkäfer (*Tenebrio molitor*) zur Darstellung von Tyrosinase 376.  
 Melanin aus Tyrosin 373.  
 — aus Dioxyphenylaminopropionsäure 375.  
 Mett, Pepsinnachweis 258.  
 Methylenblaumethode Thunbergs 381, 382.  
 Methylglukosid  $\alpha$  und  $\beta$ , fermentative Synthese von 174.  
 —  $\beta$ , Spaltung durch Emulsin 173.  
 — —, spez. Drehung 197.  
 Methylglyoxal bei der alkoholischen Gärung 210.  
 Methylgrün 68.  
 Methylorange 68.  
 Methylrot 68, 69.  
 Methylviolett 68.  
 Meyerhof, Darstellung der Cozymase 215.  
 Meyerhof, Gärungsbestimmung nach — 220.  
 —, Milchsäurebestimmung im Muskelgewebe 233.  
 — -Quotient 251.  
 Michaelis, Amylase-Bestimmung 202.  
 —, Darstellung von Saccharase 155.  
 —,  $\tau$  des Trypsins 278.  
 — -Konstante 60.  
 —, Trypsin-Bestimmung 284.  
 —, Zuckerbestimmung nach Bertrand 184.  
 — und Rona, Enteiweißung mit Kaolin 338.  
 — und Rothstein, Bestimmung von Lab 275.  
 — — —, Pepsin-Bestimmung 262.  
 Milch, Prüfung der Labwirkung 275.  
 Milchsäure, Bestimmung im Blut und Organen nach Embden, Meyerhof 232.  
 — -Laktat-Puffer 62.  
 Milchzucker s. a. Laktose.  
 —, spez. Drehung 28.  
 Mislowitzer, Potentiometer nach 79.  
 Moeckel und Frank, Zuckerbestimmung nach Bertrand 183.  
 Molekulares Drehungsvermögen 27.  
 Molisch, Reaktion auf Kohlehydrate 234.  
 Monomolekulare Reaktion 49.  
 Morawitz, Darstellung von Thrombokinase 389.  
 Morgulis, Bestimmung der Katalase 370.  
 Multitrotation 193.  
 —, Aufhebung der 55.  
 Muskelkochsaft nach Meyerhof 215.  
 Muskulatur, Bestimmung des Azetaldehyds in der 231.  
 —, — der Milchsäure in der — nach Embden, Hirsch - Kauffmann 233.  
 Nachweis der Abwehrfermente 343.  
 — der Autolyse 332.  
 — der Arginase 354.  
 — von Dioxyphenylaminopropionsäure 376.  
 — der Harnsäure in den Geweben 365.  
 — der Nukleasen 357.

- Nachweis von Pepsin im Harn 271.  
 — des Trypsins 284.  
 — der Urikase 366.  
 Nackenband (Ligamentum nuchae),  
 Herstellung nach Abderhalden  
 und Strauch 257.  
 Nährsalze bei Hefezüchtung 161.  
 Naphthochinonsulfosäure als Rea-  
 gens auf Aminosäuren nach Fo-  
 lin 339.  
 Naphthylrot 313.  
 Natriumfluorid zur Gerinnungs-  
 hemmung 386.  
 Natriumoxalat zur Gerinnungshem-  
 mung 386.  
 Natriumsulfit zum Abfangen von  
 Azetaldehyd 227.  
 Natriumwolframat zur Enteiweißung  
 nach Folin-Wu 337.  
 Natriumzitrat zur Gerinnungshem-  
 mung 386.  
 Negelein, Bestimmung der At-  
 mung und der Glykolyse im  
 Blut 244.  
 Nephelometer von Kleinmann 37.  
 Nephelometrie 37.  
 Nephelometrische Amylase-Bestim-  
 mung (Rona und van Eweyk)  
 203.  
 — Pepsin-Bestimmung 265, Trypsin-  
 Bestimmung 314 nach Rona  
 und Kleinmann.  
 Neuberg, Bestimmung des Azet-  
 aldehyds 227.  
 — und Mitarbeiter, Darstellung von  
 Hexosedi- und -monophosphat  
 222, 225.  
 —, Demonstration der Karboxylase-  
 wirkung 227.  
 —, Gärschema 210.  
 —, Sulfatase-Darstellung 153.  
 Neutralrot 68, 129.  
 Nicolai-Gefäß zur Warburg-Appara-  
 tur 133.  
 Nicolsches Prisma im Polarisations-  
 apparat 23.  
 Ninhydrin-Probe 343.  
 Nitrobenzolzozosalizylsäure 69.  
 Nitrophenol 68, 69.  
 Normalelement, Kadmium- 76, nach  
 Babinski 98.  
 Normalwasserstoff-Elektrode 84.  
 Northrop, Trypsin-Bestimmung  
 286.  
 Nukleasen 356.  
 — -Darstellung 357.  
 — -Nachweis 357, nach Pighini  
 358, nach Sachs 357, nach  
 Tschernoruzki 358.  
 Nukleinsaures Natrium (Boehrin-  
 ger) 358.  
 Nukleosidase 356.  
 —, Bestimmung nach nach Euler  
 und Brunius 361, nach Levene  
 359.  
 —, Darstellung nach Levene 358,  
 nach Tannhauser und Otten-  
 stein 360.  
 Nukleotidase 356.  
 —, Bestimmung nach Deutsch 363.  
 — -Einheit 363.  
 — -Darstellung 363.  
 Oberhefe 212.  
 Ohlsson, Amylase-Bestimmung  
 (viskosimetrisch) 200.  
 Oktylalkohol gegen Schäumen 297.  
 Optische Einrichtungen bei der Po-  
 larimetrie 22ff.  
 — Methode zum Nachweis der Ab-  
 wehrfermente 342.  
 Osram-Punktlampe 22.  
 Ostwalds Viskosimeter 42.  
 Oxalatlösung zur Blutentnahme 385.  
 Oxydasen 371, 376.  
 Palitzsch und Walbum, Trypsin-  
 Bestimmung 285.  
 Palladium, kolloidal (Anwendung  
 bei Platinelektroden) 86.  
 Pankreas-Amylase 177.  
 — - —, Bestimmung nach Will-  
 stätter, Waldschmidt-Leitz  
 und Hesse 206.  
 Pankreaserepsin 324.  
 Pankreaslipase 111.  
 —, Adsorptionsverhältnisse 112.  
 —, Adsorptionswert 112.  
 —, Darstellung nach Rosenheim  
 112, nach Willstätter und  
 Waldschmidt-Leitz 112.  
 Pankreaspulver, Darstellung von  
 Willstätter und Waldschmid  
 Leiz 278.  
 Pankreatin Rhenania 315.  
 Pankreastrypsin, Spezifität 317.  
 Papain 345.  
 — -Bestimmung 347.



- Papain-Darstellung 346, nach Kraut und Bauer 347.  
 — -Reinigung 347.  
 —,  $p_H$ - und Temperatur-Optimum 346.  
 Parachymosin 272.  
 Paraffin zum Paraffinieren von Kanälen 385.  
 — -öl gegen Schäumen 350.  
 Paralysatoren 108.  
 Pauli, Elektrolyse nach 15.  
 Pekelharing, Darstellung von Pepsin 253.  
 Pentamethoxy-triphenylcarbinol als Indikator nach Lund 270.  
 Pepsin, Bestimmung nach Ege 260, nach Fuld-Levison 259, nach Groß 263, nach Grützner 258, nach Holster 267, nach Jakobby 261, nach Mett 258, nach Michaelis-Rothstein 262, nach Rona-Kleinmann 265, nach Sörensen, Katschioni-Walther und Linderstrøm-Lang 268, nach Sörensen 264, nach Volhard-Löhlein 258, nach Willstätter 269.  
 —, Darstellung nach Hammarsten 254, 273, nach Pekelharing 253.  
 — aus Magensaft 255.  
 —, Reinigung nach Forbes 255, nach Marston 256.  
 —, freies — im Magensaft 270.  
 —, Gesamt- im Magensaft 271.  
 —, kristallisiertes nach Northrop 257.  
 —, Nachweis von — im Harn 271.  
 —,  $p_H$ -Optimum 104.  
 Peptidspaltung, Bestimmung nach Willstätter und Mitarbeiter 305 ff., polarimetrisch nach Abderhalden 328, manometrisch nach Krebs und Donegan 329, nach Linderstrøm-Lang 312.  
 Pergament-Membran zur Dialyse 19.  
 Peroxydase aus Meerrettich, Darstellung und Bestimmung nach Willstätter und Stoll 378, 379.  
 — -Einheit 380.  
 Pflanzenfermente, proteolytische 345.  
 $p_H$  (Wasserstoffexponent) s. a. Wasserstoffionen 53, 61.  
 — -Messung nach Michaelis 90.  
 Phenolphthalein 68.  
 — bei der Formoltitration 289.  
 Phenolrot 69.  
 Phosphatase 144.  
 —, Bestimmung 145 ff.  
 —, Darstellung nach Erdtman 144, nach Forrai 145, nach Tomita 145.  
 —, Glycerophosphatase 152.  
 — aus Hefe 151.  
 — aus Pferdeniere 152.  
 —, Plasmaphosphatase 153.  
 —, Saccharophosphatase 152.  
 Phosphatlösung, Standard- 145, 193.  
 Phosphatpuffer 121, 199, 202, 206, nach Michaelis 66, nach Sörensen 64.  
 Phosphor-Bestimmung, kolorimetrisch nach Embden 150, nach Kuhn 150, nach Kuttner und Cohen 145, nach Lieb 146.  
 Phthalat-Puffer 65.  
 Phytolipase-Einheit 132.  
 Pighini, Nachweis der Nukleasen 358.  
 Plasma, Gewinnung von Nativ- 384.  
 —, Magnesiumsulfat- 389.  
 —, Salz- 387.  
 Plasmaphosphatase 153.  
 Platin-Elektrode 86, Vergoldung von — 93.  
 Platinierung von Platin-Elektroden 47, 85, 86.  
 Polarimetrie 22, 24. [192.  
 Polarimetrische Zuckerbestimmung — Methode Abderhalden und Koelker zur Erepsin-Bestimmung 329.  
 Polypeptide s. a. Peptid.  
 —, Bestimmung nach van Slyke 294.  
 —, Mikro-Bestimmung nach Graßmann und Heyde 310.  
 —, Titration nach Willstätter 306.  
 Potentiometer nach Mislowitzer 79.  
 Pregl und de Crinis, refraktometrischer Mikro-Nachweis der Abwehrfermente 344.  
 Pringsheim und Gorodiski, Bestimmung der Speichel-Amylase 209.  
 — — —, Darstellung der Speichel-Amylase 176.

- Prisma, Hilfs-, im Refraktometer 33.  
 Protease aus Hafer 345.  
 Proteolyse, Bestimmung durch Formoltitration 289, nach van Slyke 294.  
 Proteolytische Fermente 253.  
 — Pflanzenfermente 345.  
 Prunasin, Spaltung durch Emulsin 173.  
 Prunus domesticus zur Darstellung von Emulsin 173.  
 Puffer 61 ff.  
 — -Lösungen nach Michaelis 62, nach Sörensen 63.  
 Pulfrichsches Refraktometer 30.  
 Purinamidasen 356.  
 Purine, Trennung der freien — und der Nukleoside nach Krüger u. Salomon 361, nach Tannhauser und Ottenstein 360.  
 Purpurogallinzahl 380.  
 Pyrogallol zur Peroxydase-Bestimmung 379.
- Quecksilber**, Reinigung 84.  
 —, spez. Gewicht 135.  
 — für Gefäß-Eichung in der Warburg-Apparatur 135.  
 Quecksilbersulfat zur Fällung der Purinbasen 357.
- Raffinose**, Spaltung durch Emulsin 173.  
 Raper und Wormall, Tyrosinase-Bestimmung 373.  
 Raubitschek, Darstellung des Erepsins 323.  
 Reaktion, nullter Ordnung 49.  
 —, erster Ordnung 49.  
 Refraktometrie 28, 33.  
 Refraktometer nach Pulfrich 30.  
 Refraktometrische Fibrinogenbestimmung nach Starlinger 386.  
 — Methode zum Nachweis der Abwehrfermente 344.  
 Reihenprinzip bei Fermentuntersuchungen 20.  
 Rheostatenkästen, Stöpsel 75.  
 Ribonukleosidase s. Nukleosidase.  
 Ribopolynukleotidase, Darstellung nach Jones 359.  
 Rimini-Reaktion auf Azetaldehyd 231.
- Ringerlösung 238.  
 Rizinlösung nach Jakoby 262.  
 Rizinuslipase 118.  
 —, Bestimmung nach Willstätter-Waldschmidt-Leitz 131.  
 —, Darstellung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz 118.  
 — -Einheit 132.  
 Röhren-Voltmeter 94.  
 Rohrzucker, spez. Drehung 28.  
 Rohrzuckerspaltung, fermentative Kinetik 51.  
 Rona und van Eweyk, Amylase-Bestimmung (nephelometrisch) 203.  
 — und Gabbe, Prüfung von Labwirkung 277.  
 — und Kleinmann, nephelometrische Trypsin-Bestimmung 314.  
 — — —, Pepsin-Bestimmung 265.  
 — und Lasnitzki, gasanalytische Bestimmung der Lipase 132.  
 — und Michaelis, Enteiweißung mit kolloidalem Eisenhydroxyd 183, 184, 338.  
 — — —, stalagmometrische Lipase-Bestimmung 119.  
 — und Mislowitzer, Nachweis der Autolyse 332.  
 — und Wilenko, Glykolyse im Blut 252.  
 Rosenheim, Pankreaslipase-Darstellung 112.  
 Russula delica zur Darstellung von Lakkase 377.
- Sachs, Nachweis der Nukleasen 358.  
 Saccharase 155.  
 —, Adsorption an Kaolin, an Tonerde 158, 159, 162, 163.  
 —, Darm- 169.  
 —, Darstellung aus Hefe nach Euler und Josephson 150, nach Hudson 157, nach Michaelis 155, nach Willstätter 155, 159.  
 — -Einheit 169.  
 — -Inversionsfähigkeit der 167.  
 —,  $p_H$ -Optimum 102.  
 — -Reinigung 162 ff.  
 —, Saccharasewert 167.  
 —, Trennung von Maltase 171.  
 — -Vergleichszeitwert 167.  
 — -Zeitwert 166.

- Saccharometer von Schrötter und Einhorn 217.  
 Saccharomyces fragilis zur Darstellung von Laktase 175.  
 Saccharophosphatase 152.  
 Saccharasewert 167.  
 Safranin zur Fällung von Pepsin 256.  
 Salaskin, Bestimmung des Erep-sins 326.  
 Salizylase, Darstellung nach Ja-coby 377.  
 — -Nachweis 377.  
 Salizin, spez. Drehung 197.  
 Salkowski, Entzuckerung 234.  
 —, Nachweis der Autolyse 332.  
 Salzsäure, alkoholische 0,1 n 269.  
 Sauerstoff, Absorptionskoeffizient in Wasser 137.  
 Schenck, Enteiweißung 336.  
 Schittenhelm, Darstellung von Guanase und Adenase 364.  
 —, Darstellung der Urikase 366.  
 Schmalfuß und Lindemann, Bestimmung von Dioxyphenylaminopropionsäure neben Tyrosin 375.  
 Schmelze, Soda-Salpeterschmelze 146, 147.  
 Schmidt, Thrombingerzeugung 387.  
 Serum, Enteiweißung 338.  
 Serumlipase 118.  
 Van Slyke, Methode zur Bestimmung der Aminosäuren und Polypeptide 294, 302.  
 — — -Apparat, Mikro-Vorrichtung 300.  
 Smorodinzew, Darstellung und Bestimmung des Histozyms 351.  
 — und Adowa, Modifikation der Grützner-Methode 258.  
 Sojabohnen 349.  
 Sorbose, Tabelle zur Bertrand-Methode 187.  
 Sörensen, Formoltitration 289.  
 —, Pepsin-Bestimmung 264.  
 —, Katschioni-Walther und Linderström-Lang, Pepsin-Bestimmung 268.  
 Sörensens Standard-(Puffer-)Lösungen 63.  
 Speichel-Amylase 176.  
 —, Bestimmung nach Pringsheim und Gorodiski 209.  
 Speichel-Gewinnung nach Hoppe-Seyler 176.  
 Spezifische Drehung 26.  
 Stalagmometrische Lipase-Bestimmung nach Rona u. Michaelis 119, nach Willstätter und Memmen 123.  
 Standard-tzetat 89, 90.  
 Staelia er, Fibrinogen-Bestimmung 386.  
 Stärke-Jodfärbung 203.  
 Stärkelösung für die Jodometrie 336.  
 Steudel und Suzuki, Nachweis der Harnsäure 365.  
 Stickstoff-Bestimmung nach Folin 336.  
 — — —, Mikro- 334.  
 —, formoltitrierbarer 289.  
 — -Gas, Befreiung von Sauerstoff 240.  
 — -Tabelle 298.  
 Stromschlüssel nach Müller 93.  
 Strychnin-Molybdatreagens 150.  
 Succus Caricae Papayae 347.  
 Sulfatase 153.  
 —, Bestimmung 154.  
 —, Darstellung nach Neuberg 153.  
 Sulfat-Molybdänreagens für die Phosphorbestimmung 146.  
 Sulfosalizylsäure zur Serum-Trübung nach Michaelis 262, nach Rona und Kleinmann 265.  
 Synthese, fermentative, von Ethern 143, von Glukosiden 174.  
 Takadiastase 180, 351.  
 Taka-Esterase 142.  
 Tannhauser und Ottenstein, Darstellung der Nukleosidase 360.  
 Tannin, Hefereinigung mit 165.  
 Temperaturkoeffizient 53, 60.  
 Temperaturkonstante von Arrhenius 53.  
 Thermobarometer 138.  
 Thermostat 61.  
 Thiosulfatlösung, Einstellung mit Jodatlösung 232.  
 Thrombin, Bestimmung nach Wohlgemuth 389.  
 —, Gewinnung nach Bleibtreu-Atzler (Tsunoo) 388, nach Howell 387, nach Schmidt 387.  
 Rona, Fermentmethoden, 2. Auflage.

- Thrombokinas, Darstellung nach Morawitz 389.
- Thunberg, Methylblaumethode für Dehydrasen 381.
- Thymol als Konservierungsmittel 20.
- Thymolblau 69.
- Thymolphthalein 68.
- bei der Formoltitration 289, 292.
- Titration, elektrometrische 88.
- Toluol als Konservierungsmittel 19.
- Tomita, Phosphatase-Darstellung 145.
- Tonerde s. a. Aluminiumhydroxyd.
- , Adsorption von Maltase 170, von Saccharase 159, 160, von Pankreaslipase 178.
- Tonerdegel AlOOH 7.
- zur Trennung von Maltase und Saccharase 171.
- Traubenzucker s. Zucker, Glukose.
- , spez. Drehung 28.
- , Bestimmung nach Bertrand 180, nach Hagedorn-Jensen 189, nach Michaelis 184, nach Möckel und Frank 183, nach Willstätter und Schudel 191.
- Trennung von Erepsin und Hefetrypsin 282.
- von  $\beta$ -Glukosidase und Emulsin 174.
- von Maltase und Saccharase 171.
- von Malzamyase und Maltase 180.
- von Pankreasamyase, Lipase u. Trypsin 177, 279.
- von Trypsin und Enterokinase 317, 319.
- von Trypsin und Erepsin 324.
- Tributyrynlösung zur Esterasebestimmung 119, 139.
- , Reinigung nach Willstätter 123.
- Trichloressigsäure zur Enteiweißung 337.
- Triphenylmetanfarbstoffe als Indikatoren 270.
- Tristearin als Adsorbens von Lipase 114.
- Trockenhefe nach Lebedew 212.
- Trocknung von Organen zur Fermentgewinnung 2.
- Tropäolin 00 68.
- Tropfmethode zur Messung der Oberflächenspannung 119.
- Tropfpipette 120.
- Trübungsmessung 37.
- Trypsin, Aktivierung 278, 308.
- , Bestimmung nach Fermi modif. von Palitzsch und Walbum 285, nach Groß, Fuld und Michaelis 284, nach Northrop 286, nach Rona und Kleimann 314, nach Willstätter 305, nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz 307, nach Willstätter und Persiel 308, nach Willstätter, Dunaituria u. Künstner 311.
- , Darstellung nach Michaelis 278, nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz 278, 281.
- , Darstellung von enterokinase- und erepsinfreiem — 320, 321.
- -Einheit 309, 311, 312.
- ,  $p_H$ -Optimum 106.
- , Trennung von Enterokinase 317, 319.
- , — von Erepsin 324.
- , — von Lipase und Amylase 279.
- , — von Pankreasamyase 177.
- Tschernoruzki, Nachweis der Nucleasen 358.
- Tsuchihashi, Darstellung und Bestimmung der Katalase 367, 370.
- Tyrode-Lösung 230.
- Tyrosinase 371.
- , Bestimmung nach Bach 372, nach Haehn und Stern 374, nach Raper und Wormall 373.
- Ultrafilter 13.
- , Darstellung nach Giemsa 14, nach Ostwald 13, nach Wha 13.
- U-Elektrode 88.
- Unterhefe 212.
- Urease, Bestimmung nach Euler und Brunius 351, nach Lövgren 349.
- , Darstellung nach Jakoby und Sugga 349.
- ,  $p_H$ -Optimum 104.
- Urikase, Darstellung nach Battelli und Stern 366, nach Schittenhelm 366.

- Veraschung 146.  
 Vergleichszeitwert der Saccharase 167.  
 Vergoldung von Platinelektroden 93.  
 Veronal-Puffer nach Michaelis 66.  
 Verseifungszahl, Bestimmung der 127.  
 Verzuckerungsfähigkeit 208.  
 Viskosimeter von Ostwald 42.  
 Viskosimetrie 42.  
 Viskosimetrische Bestimmung der Amylase (Ohlsson) 200.  
 — Pepsinbestimmung nach Holster 267.  
 Volhard-Löhlein, Pepsin-Bestimmung 258.  
 Waldschmidt-Leitz, Bestimmung von Erepsin 325.  
 — —, Darstellung der Enterokinase 318.  
 — —, — des Erepsins 323, 324.  
 — —, — von erepsinfreier Enterokinase 321.  
 — — und Linderström-Lang, Darstellung von enterokinasefreiem Trypsin 320.  
 Walpole-Prinzip zur Farbmessung 293.  
 Warburg-Apparatur 133.  
 — -Eichung der Gefäße 133 ff.  
 Warburg, Bestimmung der Glykolyse 237.  
 Warburg-Methode zur Lipasebestimmung 132.  
 Warburg, Dorner und Meyerhof, Bestimmung der Hefegärung 220.  
 Wasser, Refraktometerwerte 32.  
 Wasserbad, Temperatur-Konstanthaltung im 61.  
 Wasserstoff, Befreiung von O<sub>2</sub> 86.  
 — -Donatoren 382.  
 — -Elektrode, normal 72.  
 — -Entwicklung aus Kippschen Apparat 86.  
 Wasserstoffionenkonzentration s. a.  $p_h$  61 ff.  
 —, Bestimmung mittels Indikatoren 67 ff.  
 —, elektrometrisch 71 ff.  
 —, Messung mit Röhren-Voltmeter 94.  
 —, optimale 100 ff.  
 Wasserstoffionenkonzentration, Umrechnung in  $p_h$  61, 62.  
 — und Fermentumsatz 53.  
 Wasserthermostat 238.  
 Weinsäurepuffer 62.  
 Weston-Element 76, 98.  
 Wha, Ultrafilter nach 13. [45.  
 Wheatstonesche Brücken-Anordnung  
 Widerstandsgefäß 47.  
 Willstätter, Darstellung des Hefetrypsins 282.  
 —, Pepsin-Bestimmung 269.  
 —, Titrimetrische Bestimmung der Proteolyse 305.  
 —, titrimetrische Lipasebestimmung 125.  
 — und Bamann, Trennung von Maltase und Saccharase 171.  
 — und Csányi, Darstellung und Bestimmung des Emulsins 172, 194.  
 —, Haurowitz und Memmen, Darstellung von Magenlipase 117.  
 — -Memmen, stalagmometrische Lipase-Bestimmung 123.  
 — und Mitarbeiter, Bestimmung der Aminosäuren 305 ff.  
 — und Oppenheimer, Bestimmung der Laktase 199.  
 —, Oppenheimer, Steibelt, Bamann, Darstellung und Bestimmung der Maltase, 169 194.  
 —, Racke und Schneider, Darstellung von Saccharase 157, 159.  
 —, Schneider und Bamann, Darstellung von Saccharase 156.  
 — -Schudel, Zuckerbestimmung 191.  
 — und Steibelt, Bestimmung der Hefegärung 217.  
 — und Stoll, Peroxydase-Darstellung und Bestimmung 378.  
 — und Waldschmidt-Leitz, Bestimmung der Enterokinase 322.  
 — —, Darstellung von Rizinuslipase 118.  
 — —, Darstellung des Trypsins 278, 282.  
 — —, Rizinuslipase-Bestimmung 131.  
 —, Waldschmidt-Leitz u. Hesse, Amylase-Bestimmung 206.  
 —, — —, Darstellung von Pancreasamylase 177.

- Willstätter, Waldschmidt-Leitz, Persiel, Dunaiturria, Künstner 305, 307, 308, 311.  
 — und Weber, Bestimmung der Peroxydase 380.  
 Wohlgemuth, Amylase-Bestimmung 201.  
 —, Darstellung von La 272.  
 —, Thrombin-Bestimmung 388  
 Wöhlisch, Wöhlisch und Pieritz, Gerinnungszeit-Bestimmung 395.
- Xanthin 364.  
 Xanthinoxydase 364.  
 Xylose, Tabelle zur Bertrand-Methode 187.
- Zeitwert des Emulsins 173, 195, 197.  
 — der Laktase 176.  
 — der Maltase 170.  
 — der Saccharase 166.  
 Zinnchlorürlösung zur Eiweißfällung 264.  
 Zitrat-Standard-Lösung nach Sörensen 64.  
 Zucker s. a. Glukose, Traubenzucker.  
 —, Entfernung von — nach Salkowski 233.  
 Zuckerbestimmung nach Bertrand 180, nach Hagedorn-Jensen 189, nach Willstätter-Schudel 191 (Modifikation von Auerbach und Bodländer 192).  
 —, polarimetrisch 192.