

Zur Chemie der Phosphorleber.

Von
J. Meinertz.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 1. April 1905.)

Zur Frage der fettigen Degeneration hat in letzter Zeit wiederholt¹⁾ Waldvogel das Wort ergriffen, indem er darauf hinwies, daß es nicht angängig sei, die Substanz, die sich in den zerfallenden Zellen in Gestalt von fettähnlichen Körnchen anhäuft, einfach mit den in Äther löslichen Fettsubstanzen zu identifizieren. Er konnte zwar bei seinen Versuchen mit Hundelebern die Angaben von Kraus²⁾ und Siegert³⁾ bestätigen, daß bei der Autolyse eine irgendwie bedeutsame, der mikroskopischen Veränderung entsprechende Vermehrung des Ätherlöslichen nicht eintrat, fand dagegen eine erhebliche Zunahme des Alkoholrückstandes. Diese beruht nach ihm auf einer Vermehrung des Lecorins, der Fettsäuren, des Cholesterins und der Neutralfette, während die Menge des Lecithins abnahm. In all diesen Beziehungen bestanden bemerkenswerte Ähnlichkeiten zwischen der Autolyse und der Phosphorvergiftung. Besonders merkwürdig ist aber die Angabe, daß bei beiden Prozessen Protagon in der Leber in erheblichen Mengen zu finden sei. Der als Protagon angesprochene Körper wurde in folgender Weise gewonnen: die feinzerhackte Leber des mit Phosphor vergifteten

¹⁾ Zentralblatt für Stoffwechsel- u. Verdauungskrankheiten, Nr. 18, S. 405, 1903.

Zentralblatt f. allg. Pathol. u. pathol. Anat., S. 97, 1904.

Virchows Archiv, Bd. CLXXVII, S. 1.

Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 200.

²⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. XXII.

³⁾ Hofmeisters Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., 1901.

Tieres wurde mit der vierfachen Menge absoluten Alkohols bei 45° unter Anwendung eines Rührers 3 Stunden lang extrahiert und dies Verfahren an dem Rückstande nach Filtrieren noch zweimal wiederholt. Beim Stehen in der Kälte fiel aus dem 2. und 3. Extrakte ein reichlicher, fast weißer, fettflockiger, kristallinischer Niederschlag aus, der sich aus warmem Alkohol (45°) umkristallisieren ließ und von W. als Protagon angesehen wird. Aus normalen Lebern dagegen konnte unter gleichen Bedingungen nur eine ganz geringe Menge der erwähnten Substanz gewonnen werden. Charakterisiert wurde diese Substanz 1. durch die angegebenen Löslichkeitsverhältnisse, 2. durch das mikroskopische Aussehen: prachtvolle Kristalldrüsen aus feingeschlängelten, glänzenden Nadeln, ohne daß dunklere Substanzen zwischen ihnen gelagert sind, 3. durch die Überführung in Cerebrin durch Verwendung heißeren Alkohols, 4. durch den Stickstoffgehalt: in 2 Bestimmungen betrug dieser 4,0 resp. 4,08%. Auf die angeführte Weise konnte z. B. aus einer Phosphorleber fast 1 g auf 100 g Organmenge, aus einer normalen Leber nur wenige Milligramm gewonnen werden.

Diese Charakterisierung der gefundenen Substanz dürfte auch von Waldvogel höchstens als eine vorläufige, orientierende angesehen werden: denn daß durch die angegebenen Merkmale das Protagon nicht identifiziert werden kann, ist klar. Die Löslichkeitsverhältnisse haben nichts Charakteristisches an sich: daß der Körper sich in warmem Alkohol löst und in der Kälte wieder auskristallisiert, beweist nicht das Geringste für seine Identität. Ein für das Protagon durchaus charakteristisches mikroskopisches Aussehen gibt es ebenfalls nicht: verschiedene Fettarten kristallisieren z. B. in ganz gleicher Weise.

Die angebliche Überführung in Cerebrin durch Umkristallisieren des Protagon aus heißerem, etwa 60° warmem Alkohol beweist natürlich gar nichts. Cerebrin ist mikroskopisch ebenso wenig scharf charakterisiert wie Protagon. Außerdem hat noch niemand aus Protagon, das zwar bei energischer Behandlung mit Ätzbaryt neben einer ganzen Reihe anderer Substanzen auch Cerebrin liefert, durch 60° warmen Alkohol Cerebrin erhalten. Nach Angabe der älteren Autoren soll sich Protagon

allerdings in alkoholischer Lösung oberhalb 48° zersetzen, aber eine Bildung von Cerebrin ist dabei nicht festgestellt. Nach dem letzten Untersucher des Protagon, Cramer,¹⁾ verträgt diese Substanz übrigens ein wiederholtes Umkristallisieren aus kochendem absolutem Alkohol. Was schließlich den Stickstoffgehalt betrifft, so kann dieser um so weniger für die Identifizierung verwendet werden, als er, wie W. selbst angibt, mit den bisher für Protagon gefundenen Stickstoffwerten nicht übereinstimmt.

Sehr viel wichtiger für die Auffassung des Körpers als Protagon wäre es gewesen, wenn W. ihn auf Phosphorgehalt und auf Reduktionsvermögen nach hydrolytischer Spaltung geprüft hätte. Davon findet sich aber kein Wort.

Eine nähere Charakterisierung der als Protagon angesprochenen Substanz wäre um so dringender zu wünschen, als ihr Auftreten durchaus nicht konstant zu sein scheint. Meine eigenen Versuche wenigstens, die sich auf die Phosphorvergiftung erstrecken, haben zu andern Resultaten geführt. Ich will zunächst über diese berichten.

1. Versuch. Die Leber eines gewöhnlichen großen Hundes (Gew. der Leber 500 g) wurde fein zerhackt und in der von Waldvogel angegebenen Weise dreimal mit Alkohol bei 45° extrahiert. Aus allen 3 Extrakten kamen beim Stehen in der Kälte ganz geringe Mengen eines weißen, an den Wänden haftenden Niederschlages heraus, der, mikroskopisch betrachtet, aus ründlichen Drusen von Kristallnadeln bestand. Die abgegossenen Flüssigkeiten wurden unter vermindertem Drucke bei 45° zur Hälfte eingedampft. Beim Stehen in der Kälte kamen aus den so konzentrierten Extrakten noch weitere Spuren des gleichen Niederschlages heraus. Zu einer näheren Untersuchung reichte die Menge nicht aus.

2. Versuch. Ein großer Hund wurde 14 Tage hindurch täglich mit Phosphorstückchen, in Fleisch gewickelt, gefüttert, von 0.1—1 g Phosphor p. d. steigend. Nach dieser Zeit trat der Tod ein. Die Leber war von rötlich-gelber Farbe, wog 500 g und wurde in gleicher Weise wie die vorige behandelt.

¹⁾ Journal of Physiology, Bd. XXXI, S. 31.

Der Niederschlag war auch hier in allen 3 Extrakten sehr gering, zeigte dasselbe kristallinische Aussehen. In den zur Hälfte eingedampften Extrakten entstand kein weiterer Niederschlag.

3. Versuch. Ein großer Hund erhielt an 2 aufeinander folgenden Tagen je 0,1 g Phosphor in Öl subkutan injiziert. Nach 4 Tagen trat der Tod ein. Die Leber, von hell-rötlich-gelber Farbe, wog 600 g. Die 3 Extrakte wurden wieder in der angegebenen Weise hergestellt. Im 2. Extrakt entstand in der Kälte ein sehr reichlicher, schneeweißer, flockiger Niederschlag, der, mikroskopisch betrachtet, durchweg aus rundlichen Drusen feiner Nadelchen bestand. Er löste sich glatt in Äther, ebenfalls in warmem absolutem Alkohol, fast gar nicht in warmem 85%igem Alkohol, kristallisierte aus warmem absolutem Alkohol in der Kälte wieder in den gleichen schneeweißen Kristallen. Die alkoholische Lösung zeigte gegen Lakmus neutrale Reaktion. Es wurde mit reichlichen Mengen des Niederschlages die Prüfung auf Phosphor (Veraschung mit Soda und Salpeter, Auflösung in Salpetersäure, Zusatz von molybdänsaurem Ammoniak, Erhitzen) und auf Stickstoff (Glühen mit metall. Natrium, Auflösen in Wasser, Zusatz von Ferrichlorid und Ferrosulfat, Ansäuern mit HCl zum Zwecke der Berlinerblaureaktion) angestellt: weder N noch P fanden sich auch nur in Spuren. Bei der trocknen Destillation trat deutlicher Acroleingeruch auf. Die Substanz ist hierdurch als Fett charakterisiert.

Das alkoholische Filtrat wurde bei 45° zur Hälfte eingedampft: noch einmal kam in der Kälte eine mäßige Menge des gleichen Niederschlages heraus, der sich in jeder Beziehung wie der zuerst gewonnene verhielt, keine Spur von Stickstoff und Phosphor enthielt.

Auch aus dem 3. Extrakt schied sich eine erhebliche Menge desselben Niederschlages ab und eine weitere nach Eindampfung auf die Hälfte des Volumens. Alle diese Niederschläge waren kristallinisch und erweisen sich in gleicher Weise als Fett. Die Extrakte 2 und 3 wurden jetzt zusammengegossen und wieder auf die Hälfte eingedampft. Beim Stehen in der Kälte schied sich ein Öl ab, das ebenfalls aus Fett bestand,

weder Stickstoff noch Phosphor enthielt. Erst bei nochmaliger Eindampfung auf die Hälfte kam ein Öl heraus, das Spuren von Phosphor enthielt, und bei nochmaliger Eindampfung (also auf den 16. Teil der ursprünglichen Flüssigkeitsmenge) schied sich ein Öl ab, das deutliche Stickstoff- und Phosphorreaktion gab.

Mehrere der N- und P-freien Niederschläge zusammengetan, ließen sich mit Natriumalkoholat leicht verseifen, die Seife löste sich klar in Wasser: das daraus dargestellte Bleisalz war teilweise in Äther löslich, teilweise unlöslich.

4. Versuch. Ein großer Hund erhielt an 3 aufeinander folgenden Tagen je 0,03 g Phosphor subkutan. Tod am 5. Tage. Die Leber war rötlich-gelb, wog 500 g. Im 2. Extrakte entstand in der Kälte ein reichlicher kristallinischer Niederschlag, der sich genau wie im vorigen Versuch verhielt, keinen Stickstoff und keinen Phosphor enthielt. Auch das 3. Extrakt verhielt sich so, ebenso beide Extrakte beim weiteren Eindampfen. Bei immer weiterer Konzentration blieb schließlich ein ganz geringer Teil von dem aus Alkohol Herausgekommenen in Äther unlöslich, erst als zur Trockne eingedampft wurde, war dieser ätherunlösliche Teil erheblich.

5. Versuch. Ein mittelgroßer Hund erhielt an 2 durch einen freien Tag getrennten Tagen je 0,015 und 0,02 g Phosphor. Am 5. Tage trat der Tod ein. Die Leber war rötlich-gelb und wog 300 g. Die 3 Extrakte wurden in der üblichen Weise hergestellt. Aus dem ersten kam ein flockig-weißer kristallinischer Niederschlag heraus, der eine Andeutung von P- und N-Reaktion gab, sich im übrigen wie die andern gewonnenen Niederschläge verhielt (sich in Äther glatt löste). Die größte Menge kam wie gewöhnlich aus dem zweiten Extrakte heraus. Sie hatte in jeder Beziehung die gleichen Eigenschaften wie in den anderen Fällen, zeigte besonders schön ausgebildete Kristalle. Die Substanz zeigte auch hier keine Spur einer Stickstoff- oder Phosphorreaktion, ebensowenig die geringe Menge Kristalle, die sich nach Eindampfung auf die Hälfte abschieden. Ebenso verhielt sich das dritte Extrakt. Bei noch weitergehender Eindampfung kamen Kristalle nicht mehr heraus, sondern nur eine geringe Menge Öl.

Um die am Niederschlage haftende Flüssigkeitsmenge (die stets starke P- und N-Reaktion gab) herauszuwaschen, wurde kalter Alkohol verwendet (in dem Protagon unlöslich ist). Auch dieser zum Auswaschen benutzte Alkohol wurde auf ein kleines Volumen eingedampft: in der Kälte kam aus ihm noch eine geringe Menge des gleichen nun genugsam beschriebenen Niederschlages heraus.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß der hierbei nach der Waldvogelschen Methode aus Phosphorlebern gewonnene Niederschlag nicht aus Protagon bestand. Es ist sicher, daß statt dessen auf die angegebene Weise aus der Leber von mir nur reines Fett gewonnen wurde. Ebenso sicher ist, daß Waldvogel bei seinen Versuchen in den Fällen, in denen er einen N-Gehalt von 4% fand, einen andern Körper in den Händen gehabt haben muß. Welcher Natur dieser ist, entzieht sich der Beurteilung; ihn als Protagon anzusprechen, dafür reichen die angegebenen Merkmale, wie oben angeführt wurde, nicht aus. Es ist übrigens hervorzuheben, daß aus den Mitteilungen Waldvogels nicht hervorgeht, ob er in jedem seiner Fälle den auf die beschriebene Weise gewonnenen Körper so charakterisiert hat, wie er es angibt. Das scheint nicht der Fall zu sein. Wenigstens erwähnt er die beiden Zahlen für den N-Gehalt (4,0 u. 4,08) sowohl in seiner mit Tintemann gemeinsam herausgegebenen Mitteilung über die Phosphorvergiftung, als auch in der über die autolytischen Versuche. Es scheinen also nur diese beiden Stickstoffanalysen gemacht zu sein. In den übrigen Fällen hätte er dann einfach angenommen, daß die unter den angegebenen Bedingungen ausfallende Substanz aus Protagon bestehe.¹⁾ Sie kann aber auch ganz aus Fett bestehen, wie meine Untersuchungen lehren, und selbst wenn ihr Protagon beigemischt sein sollte, wäre es nicht gut möglich, die Trennung der beiden Substanzen in der Weise zu erreichen, wie es Waldvogel will: er löst in warmem Alkohol und betrachtet das, was in der Kälte ausfällt, als Protagon. Aber

¹⁾ Man kann sich z. B. schwer vorstellen, daß W. in den Fällen, in denen er sehr geringe Mengen von Protagon fand (z. B. 0,002%), dieses anders als durch das mikroskopische Aussehen charakterisiert hat.

Fett löst sich doch ebenfalls in warmem Alkohol und kommt in der Kälte wieder heraus. Wie sich endlich beide Körper in ihren Lösungs- und Ausfällungsverhältnissen beeinflussen, ist gänzlich unbekannt. Diese letzte Betrachtung führt uns auch auf den Grund, aus dem es gerade bei den «lipoiden Substanzen» besonders mißlich ist, aus den Resultaten der Extraktion mit den verschiedenen Lösungsmitteln quantitative Schlüsse in bezug auf die einzelnen im Extrakte enthaltenen Körper zu machen. Das macht gerade das Arbeiten mit diesen Substanzen so schwierig, daß sie in hohem Maße die Fähigkeit besitzen, sich gegenseitig in Lösung zu halten oder auszufällen.

Dies gilt nicht nur vom Protagon, das gilt auch von dem Lecithin und ebenso von dem Jecorin, das Waldvogel ebenfalls quantitativ bestimmt. Hier aber auch nur annähernde Werte oder gar solche zu erhalten, aus denen sich irgendwelche Schlüsse in bezug auf den Übergang der einzelnen Substanzen ineinander ergeben könnten, dürfte zu den absoluten Unmöglichkeiten zählen. Schon der Umstand, daß das Jecorin, obgleich es in Alkohol unlöslich ist, doch in das alkoholische Extrakt der Leber übergeht, müßte stutzig machen. Es ist ja richtig, daß das Jecorin, nachdem es wiederholt gelöst und durch Alkohol wieder gefällt und schließlich im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet ist, sich in wasserfreiem Äther nicht mehr löst. Hierauf aber ein quantitatives Verfahren zu gründen, scheint doch nicht berechtigt zu sein. Waldvogel geht bei der Jecorinbestimmung in der Weise vor, daß er den im Exsikkator getrockneten Alkoholrückstand zuerst mit Äther, dann mit Alkohol und endlich mit Wasser behandelt: Nur was schließlich vom Wasser aufgenommen wird, nennt er Jecorin. Sicher erhält er hierbei einen Teil des Jecorins. Wieviel aber bereits vorher in das Alkohol- und Ätherextrakt hineingegangen ist, entzieht sich jeder Schätzung. Wie sehr das Jecorin durch Anwesenheit anderer «lipoider Substanzen» in seinen Löslichkeitsverhältnissen beeinflußt wird, geht aus folgenden Versuchen hervor.

Jecorin gewann ich zum Zwecke anderer Untersuchungen, über die später berichtet werden wird, nach einer Modifikation

des Drechselschen¹⁾ Verfahrens. Diese Substanz zeigte alle Eigenschaften, die für Jecorin als charakteristisch angegeben werden (Löslichkeit, Fällbarkeit, Reduktionsvermögen, Baldische Reaktion),²⁾ war aber nach der ersten Fällung mit Alkohol selbst nach Trocknung im Exsikkator unter der Luftpumpe in Äther löslich, offenbar durch eine Substanz, die ihm noch beigemischt war. Durch wiederholte Umfällung mit Alkohol gelang es, diese zu beseitigen: das Alkoholätherfiltrat der Fällung gab mit Aceton noch eine weitere Fällung, und der auf solche Weise abgetrennte Körper, dessen Natur dahingestellt bleiben mag, zeigte die Löslichkeitsverhältnisse des Lecithins, reduzierte aber noch ziemlich stark.

Das so gereinigte Jecorin war, nachdem es unter der Luftpumpe über Schwefelsäure getrocknet war, in Äther völlig unlöslich.

Es wurde hiervon eine geringe Menge pulverisiert, mit Äther einige Zeit im Reagensglase geschüttelt: die ganze Menge blieb ungelöst, und im abfiltrierten Äther gab Alkohol keine Spur von Fällung. Es trat jedoch augenblicklich völlige Lösung ein, sobald zu dem Äther ein Tropfen Wasser gesetzt wurde. Aus dieser Lösung konnte das Jecorin durch Alkohol in dichten Flocken gefällt werden.

Jetzt wurde eine Lösung von Lecithin³⁾ (das ebenfalls im Exsikkator getrocknet war), in Äther zu dem Gemisch von Äther und trockenem Jecorin hinzugefügt: sofort begann sich das Jecorin zu lösen und nach weiterem Zusatz von (getrocknetem) Lecithin trat völlige Lösung ein. Aus dieser Lösung ließ sich das Jecorin durch Alkohol wieder in dichten Flocken ausfällen. Die ätherische Lecithinlösung gab eine solche Fällung mit Alkohol selbstverständlich nicht.

Auch eine Lösung von Olivenöl in Äther löste einen Teil des hinzugesetzten trockenem Jecorins: auch hier war durch

¹⁾ Journ. f. prakt. Chem., N. F., Bd. XXXIII, S. 425.

Zeitschrift f. Biol., Bd. XXXIII, S. 85.

²⁾ Archiv für Anat. u. Physiol., physiol. Abteil., Supplem.-Band, S. 100, 1887.

³⁾ Lecithin von der Firma Riedel, durch wiederholte Umfällung gereinigt.

Zusatz von Alkohol eine deutliche Fällung zu erzielen. Die ätherische Lösung des Olivenöls gab mit Alkohol in keinem Verhältnis eine Fällung.

Noch leichter trat die Lösung des Jecorins in Äther bei folgenden Versuchen ein:

Eine geringe Menge des durch wiederholte Umfällung gereinigten, im Exsikkator getrockneten Jecorins wurde zusammen mit etwa der gleichen Menge Lecithin in wasserhaltigem Äther gelöst, der Äther verdampft, das Ganze im Exsikkator unter der Luftpumpe getrocknet. Das getrocknete Gemisch löste sich jetzt leicht in Äther, das Jecorin ließ sich durch Alkohol wieder in dichten Flocken ausfällen.

Die obenerwähnte, bei der Alkoholfällung des Jecorins im Alkoholätherfiltrat bleibende Substanz wurde nach Abdampfen der Flüssigkeit zusammen mit einer beliebigen Menge getrockneten Jecorins in wasserhaltigem Äther gelöst. Nach dem Trocknen im Exsikkator löste sich dies Gemisch leicht wieder in Äther: das Jecorin ließ sich durch Alkohol wieder in dichten Flocken ausfällen. Hiermit ist aufs deutlichste bewiesen, daß nicht nur eine künstliche Vermengung anderswie gewonnenen Lecithins mit dem Leber-Jecorin letzterem die Eigenschaft der Ätherlöslichkeit erteilt, sondern daß auch in der Leber selbst eine derartige Substanz vorkommt: entfernte man diese durch Umfällen, so wurde das Jecorin nach der Trocknung ätherunlöslich, setzte man sie wieder zu, so war die Löslichkeit wiederhergestellt.

Der vermutete gegenseitige Einfluß dieser Substanzen auf ihre Löslichkeit ist also durch diese Versuche direkt bewiesen. Wahrscheinlich ist diese Fähigkeit wechselnd nach den verschiedenen Mengenverhältnissen der einzelnen Körper. Hierüber etwas auszusagen, sind wir gänzlich außerstande. Wie unmöglich es aber ist, das, was nach der Extraktion mit Äther und Alkohol schließlich in Wasser löslich ist, als die Gesamtmenge des Jecorins anzusprechen oder überhaupt eine irgendwie annähernd quantitative Bestimmung dieser Substanzen durch aufeinanderfolgende Behandlung ihres Gemisches mit Äther, Alkohol und Wasser zu erreichen, dürfte aus dem Gesagten genügend deutlich hervorgehen.

Da also irgendwelche Methoden zur quantitativen Bestimmung aller dieser «lipoiden Substanzen» bis jetzt nicht zu Gebote stehen, so kann auch die Berechtigung nicht anerkannt werden, aus den Ergebnissen solcher einfacher Trennungen mittels verschiedener Lösungsmittel irgendwelche Schlüsse zu ziehen hinsichtlich der prinzipiellen Frage, die eigentlich den Ausgangspunkt der ganzen Untersuchungsreihe Waldvogels bildet, der Frage nach dem Übergange der Eiweißkörper in Fett. Doch muß ich es mir versagen, auf diese Fragen näher einzugehen. Denn es war keineswegs meine Absicht, eine eingehende Kritik der Befunde Waldvogels zu liefern; ich hielt es aber doch für wünschenswert, die abweichenden Ergebnisse meiner Untersuchungen bekannt zu geben und im Anschluß daran auf die Schwierigkeiten hinzuweisen, die sich den Versuchen, irgendwelche quantitativen Beziehungen zwischen jenen Substanzen zu finden, entgegenstellen.

Zum Schlusse möchte ich nicht verfehlen, Herrn Professor Thierfelder für das andauernde liebenswürdige Interesse, das er meinen Untersuchungen entgegengebracht hat, meinen aufrichtigsten Dank abzustatten.