

Ein Verfahren zum Nachweis von Inosit in tierischen Geweben und Flüssigkeiten.

Von

Franz Rosenberger.

(Aus der medizinischen Universitätspoliklinik in Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. Juni 1908.)

Das Verfahren, mit Hilfe dessen Scherer⁽¹⁾ den Inosit entdeckte und dessen sich die späteren Forscher zum Nachweis der Cyklose in tierischen Organen bedienen, beruhte auf Extraktion des zerkleinerten Organes mit Wasser und Behandlung der wässerigen Lösung mit wenig differenten Fällungsmitteln (Bleizucker oder Baryt oder Tanninlösung, dann Bleiessig). Ich habe mich seiner bei der Verarbeitung von 3 ganzen Kaninchen auf einmal bedient und geringe Mengen der Cyklose erhalten. Dieser Arbeitsweise haften alle Fehler der Extraktionsmethoden an:

I. Wenn man auch noch so fein zerkleinert, ist man doch nicht sicher, daß alle Substanz in das Lösungsmittel übergeht.

II. Das Wasser hebt die Fermentwirkung nicht auf, sodaß die Möglichkeit besteht, daß während des Versuches die gesuchte Substanz teilweise zerstört wird oder eine fortgesetzte Bildung derselben erfolgt.

III. Erfordert das Eindampfen der großen Wassermassen viel Zeit, Raum und Arbeit.

Der Inosit wie der Scyllit haben nun mit dem Glykogen, von dem sie sich durch ihre große Widerstandskraft gegen Säuren unterscheiden, ihre Resistenz gegen Alkali gemeinsam;⁽²⁾ deshalb kann man die zu untersuchenden Körperteile mit Kalilauge in derselben Weise aufschließen wie bei der Bestimmung des Glykogens. Des ferneren aber gestattet es die Unempfindlichkeit der Ringzucker, selbst gegen Salpetersäure von diesem mächtigen Reagens zur Beseitigung störender Verunreinigungen Gebrauch zu machen.

Demgemäß gestaltete sich das Verfahren zur Untersuchung ganzer Tiere folgendermaßen:

Das Versuchstier wird gewogen, die dreifache Menge Wasser zum Kochen erhitzt, das Tier getötet, sofort grob zerstückelt, in das Wasser geworfen und dieses im Sieden erhalten. Unterdessen wird die der Hitze gebotene Oberfläche durch Einschnitte in die Muskulatur vergrößert. Nach 20—25 Minuten, je nach der Größe des Untersuchungsgegenstandes, löst man das Fleisch von den Knochen, zertrümmert letztere im Mörser und schickt die Weichteile durch die Hackmaschine. Die etwas abgekühlte Kochbrühe wird auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und mit Ätzkali bis zum gewünschten Gehalt (2—5%) versetzt. Die Organe gibt man nun in einen geräumigen Kolben, spült mit der Brühe nach, erhitzt sie in derselben rückfließend zunächst im Wasser- und, wenn das Schäumen aufgehört hat, im Paraffinbad bis zur Lösung. Die Brühe, die nicht absolut klar zu sein braucht, wird dann in eine große Schale gegossen, mit Salpetersäure neutralisiert und dann soviel konzentrierte Salpetersäure (spez. Gew. 1,5) zugesetzt, daß ihr Gehalt 2,5 Volumprozent freier Säure entspricht. Nun wird die unterdessen oft grau und grobflockig gewordene Flüssigkeit womöglich zunächst auf freiem Feuer, später, wenn nötig, auf dem Wasserbad auf $\frac{1}{3}$ der ursprünglich verwendeten Wassermenge unter häufigem Rühren eingedampft; sie schäumt in der Regel im Anfang stark und muß daher genau beaufsichtigt werden. Es steigt während des Eindampfens eine gelbbraune bis schwarze Masse als Rinde an die Oberfläche, die teilweise in vielen Fällen noch ganz unverseiftes Fett enthält. Ist die Lösung auf das gewünschte Quantum reduziert, so neutralisiert man sie mit heißgesättigter Barytlauge und fügt dann noch einen Überschuß von dieser hinzu.¹⁾ Die Farbe der Lösung wird dabei, wenn sie vorher, wie gewöhnlich, gelb war, rot bis graurot.

Bei basischer Reaktion erhitzt man 10—15 Minuten lang, dann wird wieder mit Salpetersäure schwach angesäuert, auf

¹⁾ Der Zeitersparnis halber vergleicht man das Volumen der Flüssigkeit in der Schale mit abgemessenen Mengen warmen Wassers in einem ebenso geformten Behälter.

ein möglichst geringes Volumen (eventuell bis zum Sirup) eingedampft und nachher 7–8 Volumprozent der augenblicklichen Flüssigkeitsmenge konzentrierter Salpetersäure in der Hitzeschußweise unter starkem Rühren zugegeben. Man erhitzt noch einige Augenblicke, bis die Reaktion beendet ist, und alkalisiert wieder mit heißgesättigtem Barytwasser. Je nach der Menge und der Widerstandsfähigkeit des Ausgangsmaterials wird dieses abwechselnde Zugeben von Säure und Lauge mehrmals wiederholt. Wenn die obenerwähnte Rinde trocken und krümelig erscheint und ein pulveriger Niederschlag, untermischt mit Krystallen, am Boden der Schale sich ansammelt, wird die Flüssigkeit bei ganz schwachsaurer Reaktion auf eine geringe Menge eingedampft. Man läßt erkalten, nutschts von dem Niederschlag ab, wäscht diesen in der Reibschale gründlich aus und vereinigt Washwasser und ursprüngliche Lösung. Wenn man sehr viel Ausgangsmaterial hatte, ist es oft notwendig, den Niederschlag noch mehrmals gesondert mit Salpetersäure und Barytwasser zu behandeln. Ich habe ihn nach derartigem Vorgehen dann stets frei von Cyklose gefunden.

Das Filtrat und die Washwasser werden dann mit Bleizuckerlösung in üblicher Weise gefällt; es empfiehlt sich, gut absetzen zu lassen, dann abzunutschen und in der Reibschale den Niederschlag sorgfältig mit verdünnter Bleizuckerlösung auszuwaschen, da dieser leicht Inosit zurückhält. Das Filtrat und das Washwasser von der Bleizuckerfällung werden nun in der Wärme mit Bleiessig ausgefällt, unter Zugabe von etwas Ammoniak 12–24 Stunden stehen gelassen, von dem Niederschlag abgenutscht und dieser mit Schwefelwasserstoff gespalten. Man soll ihn nicht auswaschen, da er leicht zersetzlich ist; vielmehr das Filtrat vom Schwefelblei eindampfen und entweder, wenn es nicht mehr stark gefärbt ist, nochmals mit Bleiessig fällen oder bei Gegenwart von mehr Verunreinigungen wieder auf den Sirup Salpetersäure und Barytwasser wie oben angegeben einwirken lassen.

Die zur Erkennung der Cyklose angegebenen Reaktionen⁽³⁾ sind gewiß charakteristisch, gelingen aber nur, wenn der Ringzucker sehr rein ist. Ein positiver Ausfall der Probe ist nach

der Anwendung des vorstehenden Verfahrens für die Gegenwart von Inosit beweisend, ein negativer ist es ohne weiteres nicht. Ich habe mich mehrfach überzeugt, daß, wenn eine Probe des übrigbleibenden Niederschlags zunächst einen negativen Ausfall der Inositreaktion gab, derselbe deutlich positiv wurde, sobald das Untersuchungsobjekt noch mehr gereinigt war.

Zu dieser Reinigung ist besonders zu empfehlen ausgiebiger Gebrauch der Salpetersäure, ganz besonders gut eignet sich aber die Fällung des schon ziemlich reinen Inosits mittels Ätzbaryt in methylalkoholischer Lösung. (4) Dieser Niederschlag löst sich leicht in Wasser, der Baryt läßt sich in der Wärme mit Kohlensäure vom Inosit trennen, der dann in üblicher Weise durch wiederholtes Eindampfen, Aufnehmen in Wasser und Filtrieren vom Baryumcarbonat befreit wird. Mit Vorteil bediente ich mich öfters zur Entfernung grober Verunreinigungen warmkonzentrierter Quecksilberchloridlösung.

Ursprünglich versuchte ich, statt mit Baryt, mit Kalilauge zu neutralisieren; die Lösung wird dabei meist sehr dunkel, sodaß man den Punkt der Neutralisation nicht erkennen kann, sie wird aber auch außerordentlich hygroskopisch. Der Baryt hat vor dem Kali aber noch den Vorzug, daß er Oxydationsprodukte krystallinisch niederschlägt.

Die Methode eignet sich auch zur Untersuchung von Blut, Milch, Ascitesflüssigkeit und Eiter. Für den Urin fällt die Behandlung mit Ätzkali weg, während sich mir auch hier das abwechselnde Erhitzen mit Salpetersäure und Barytwasser zur Isolierung kleinster Mengen der Cyklose aus den Sirupen großer Harnmengen als sehr vorteilhaft erwies.

Mit Hilfe vorgezeichneten Verfahrens fand ich in den ganzen Körpern von unmittelbar zuvor durch Nackenschlag getöteten Kaninchen keinen Inosit, dagegen gelang der Nachweis desselben noch in 5 g Rindfleisch, welches mehrere Tage lang «abgehängt» gewesen war. Selbst kleinste Mengen eigens zugesetzten Ringzuckers wurden aus Blut und Fleisch wiedergefunden.

Rindfleisch enthält unmittelbar nach der Schlachtung keinen Inosit; in dem Maße, als man es unter Chloroformzusatz im Brutschrank stehen läßt, wird der Gehalt an solchem

größer. Kaninchenkörper, der Autolyse unterworfen, werden inosithaltig. — Es ist also in derartigen Organen zwar kein fertiger Ringzucker enthalten, sondern eine Vorstufe desselben, die ich als «inositogene Substanz» bezeichnen möchte. Keinen fertigen Inosit, wohl aber letztere, konnte ich in der Milch nachweisen. Dagegen ist das undefibrinierte Rinderblut frei, sowohl von Ringzucker, als auch Inositogen. Fertigen Inosit neben seiner Muttersubstanz konnte ich in der menschlichen Placenta schon im sechsten Fötalmonat nachweisen, desgleichen in frischen Hühnereiern. Harn normaler Menschen und Hunde enthält die Cyklose in geringer Menge, Urin von Kaninchen, die mit Hafer und Kohl gefüttert wurden, dagegen nicht. Auch der Organismus von Kaninchen, die durch Inanition getötet wurden, ist noch imstande, Inosit zu bilden.

Die Ausarbeitung eines bequemen quantitativen Verfahrens zur Bestimmung der Cyklose erscheint im hohen Grade wünschenswert, denn durch die Leichtigkeit, mit der man stets den in der Zeiteinheit im Untersuchungsobjekt vorhandenen Gehalt an inositogener Substanz dadurch feststellen kann, daß man es nach der Tötung aseptischer Autolyse überläßt und dann den gebildeten Inosit an einem festen Termin (z. B. nach 8 Tagen) bestimmt, erscheinen mir Abartungsversuche in dieser Richtung aussichtsreich.

Literatur.

1. Ausführlich bei Cloëtta, Liebigs Ann., 1856, Bd. XCIX, S. 291.
 2. Scherer, Liebigs Ann., 1850, Bd. LXXIII, S. 322.
Maquenne, Ann. de chimie et physique, 1887 [VI], Bd. XII, S. 100.
 3. Neubauer und Vogel, Analyse des Harnes, 10. Aufl., bearbeitet von Huppert, S. 174.
 4. Girard, Comptes rendus de l'acad. des sciences, Bd. LXVII, S. 820.
-