

Über Hemmung der Blausäurewirkung in lebenden Zellen.

Von
Otto Warburg.

Mit sieben Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus der medizinischen Klinik in Heidelberg.)

Der Redaktion zugegangen am 24. November 1911.)

Während sich für eine große Reihe oxydationshemmender Substanzen einfache Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung ergeben haben,¹⁾ ließ sich die Blausäure keiner der bisher aufgestellten Gruppen zuordnen. Die Ausnahmestellung der Blausäure wurde schon mehrfach hervorgehoben,²⁾ so war sie z. B. die einzige oxydationshemmende Substanz, mit deren Hilfe sich die Zellteilungsgeschwindigkeit in weiten Grenzen beeinflussen ließ, während die übrigen lipoidlöslichen Stoffe, wenn sie die Atmung herabsetzten, die Zellteilung vollständig aufhoben.

Von ganz anderer Seite haben sich nun Tatsachen ergeben, die das Besondere der Blausäurewirkung in neuer Weise beleuchten und für die Aufklärung ihrer Wirkungsweise vielleicht von Bedeutung werden können. Folgendes wurde festgestellt: Zahlreiche Substanzen, wie Alkohole, Formaldehyd, Urethane, substituierte Harnstoffe, addieren sich in ihrer Wirkung auf die Oxydationsprozesse; beträgt z. B. die Hemmung durch Urethan 30 %, durch Formaldehyd 20 %, so ist die Hemmung durch beide zusammen 50 % oder etwas mehr. Bringt man dagegen Blausäure und Alkohole, Blausäure und Urethane, gleichzeitig in die Zelle, so ist die Hemmung keineswegs gleich der Hemmung durch die Summe der Komponenten, sondern be-

¹⁾ O. Warburg, Beziehungen zwischen Konstitution und physiologischer Wirkung, Verhandlungen des Deutschen Kongresses für innere Medizin, Bd. 28 (1911), S. 553.

²⁾ O. Warburg, Diese Zeitschrift, Bd. 66, S. 324.

deutend kleiner, bei passender Wahl der Konzentrationen sogar kleiner als die Hemmung durch die Blausäurekomponente allein. Man kann dieses paradoxe Resultat auch so ausdrücken, daß die Atmung blausäurebeladener Zellen gesteigert wird durch Zufügung von Substanzen, die in den benutzten Konzentrationen allein die Atmung hemmen. Diese Atmungssteigerung ist nicht etwa gering, sondern betrug bis zu 50% der Atmung in Blausäure allein.

Selbstverständlich dürfen zu derartigen Versuchen nur Substanzen ausgewählt werden, die mit der Blausäure *in vitro* nicht reagieren. Die von mir verwendeten Stoffe waren Alkohole und Urethane der Fettreihe. Wollte man, unseren chemischen Kenntnissen zum Trotz, an der Reaktionslosigkeit dieser Körper *in vitro* dennoch zweifeln, so läßt sich ein sehr gewichtiger Grund gegen eine Reaktion *in vitro* anführen; es wirken nämlich nicht äquimolekulare Mengen Amylalkohol und Äthylalkohol, Butylurethan und Methylurethan gleich stark auf die Blausäurehemmung, sondern die höhermolekularen, oberflächenaktiveren, lipoidlöslicheren, mit einem Wort biologisch wirksameren, beeinflussen auch die Blausäurehemmung viel stärker.

Wir nehmen also, mit ganz überwiegender Wahrscheinlichkeit, eine Reaktion der Substanzen in der Zelle an, und es fragt sich nur noch, was wir über die Natur dieser Reaktion aussagen können. Hier ist es wichtig, zu erwähnen, daß die Beeinflussung der Blausäurehemmung nicht progressiv ist, Methylurethan wirkt in 6 Stunden nicht stärker als in 3 Stunden. Es handelt sich demnach nicht etwa um eine allmähliche Entgiftung, sondern das in Betracht kommende Gleichgewicht stellt sich sehr schnell ein. Weiterhin ist auch in diesem Zusammenhang wichtig, daß höhere Glieder einer homologen Reihe stärker wirken als niedere. Der Gedanke an eine Verdrängung von Oberflächen, etwa wie sie Rona und Michaelis¹⁾ oder Masius²⁾

¹⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. 15, S. 209. Nach diesen Autoren wirken z. B. höher molekulare Alkohole der Fettreihe viel stärker verdrängend als Alkohole mit niedrigem Molekulargewicht.

²⁾ Über die Adsorption in Gemischen, Dissertation Leipzig, 1908

an Tierkohle beobachtet haben, liegt nahe, ohne daß wir diese Hypothese genügend stützen und ihr so einen besonderen Wert verleihen könnten.

Als Versuchsmaterial wurden wieder junge Erythrocyten von Gänsen benutzt: die Methode der Sauerstoffbestimmung ist, entsprechend den erhöhten Anforderungen, die derartige quantitative Untersuchungen an die Genauigkeit stellen, etwas modifiziert worden. (Siehe Methode.)

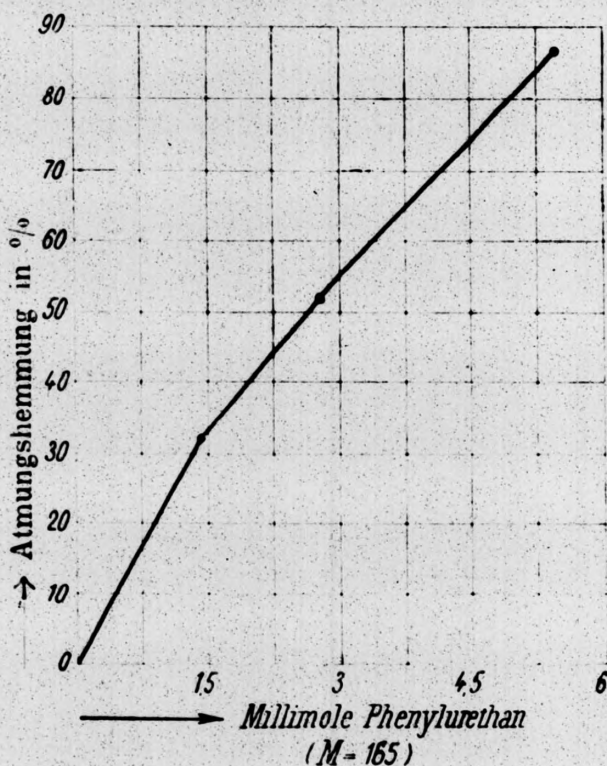
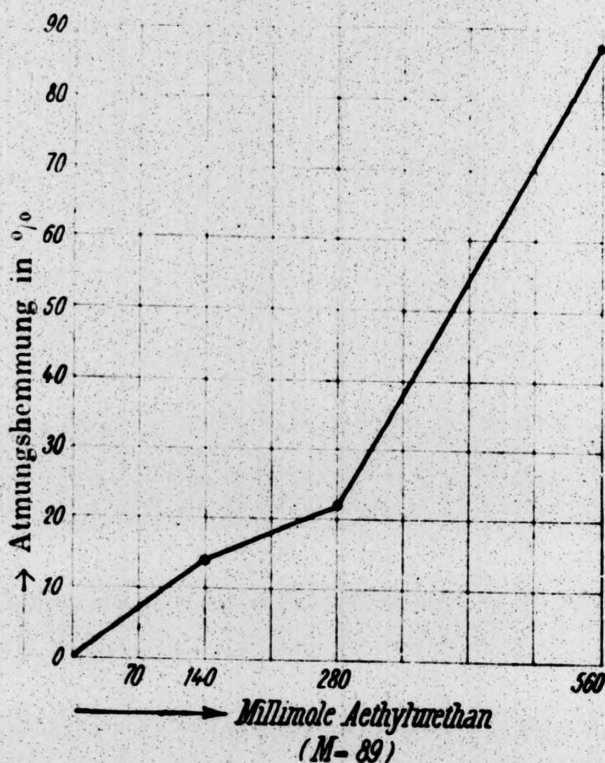
I.

Über das Anwachsen der Wirkung mit der Konzentration.

Die erste Frage, die sich beim Nachdenken über die Summationswirkung verschiedener Substanzen aufdrängt, ist die nach der Summationswirkung ein und derselben Substanz, mit anderen Worten, nach der Abhängigkeit der Atmungshemmung von der Konzentration. Unter Konzentrationen verstehen wir hier stets die der umspülenden Lösung und sind uns bewußt, daß die Konzentrationen in der Zelle, dort, wo die Substanzen wirken, davon verschieden sind, und auch nicht notwendigerweise proportional den Konzentrationen in der Lösung wachsen müssen.

Die Resultate ergeben sich aus den nachstehenden Kurven, in denen auf der Abszissenaxe die Konzentrationen in Millimolen, auf der Ordinatenaxe die prozentischen Atmungshemmungen eingetragen sind. Die Suspensionsflüssigkeit war immer eine 0,9%ige Kochsalzlösung. Die Konzentrationsbereiche, die in Betracht kommen, unterscheiden sich so sehr (bis um das Zehntausendfache), daß aus einer Kurventafel mit gemeinsamem Maßstab der Gang der meisten Kurven kaum zu ersehen wäre. Da es aber hier allein auf den Gang der Kurven ankommt, so wurden die Maßstäbe nach Bedarf variiert.

Im allgemeinen ersehen wir, daß für eine Anzahl Substanzen annähernde Proportionalität besteht; daß bei einigen kleine Konzentrationen relativ schwächer wirken als größere, die Wirkung auf die Oxydationsprozesse wächst schneller als die Konzentration. Das umgekehrte, relativ

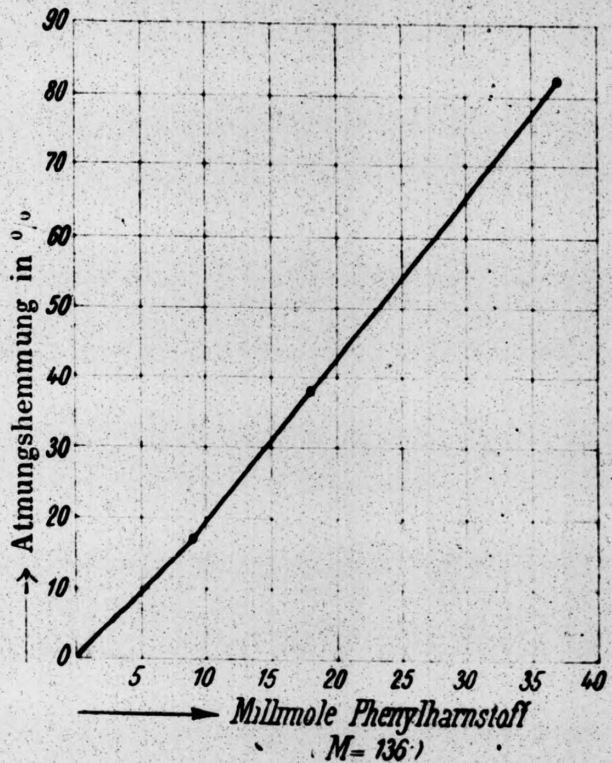
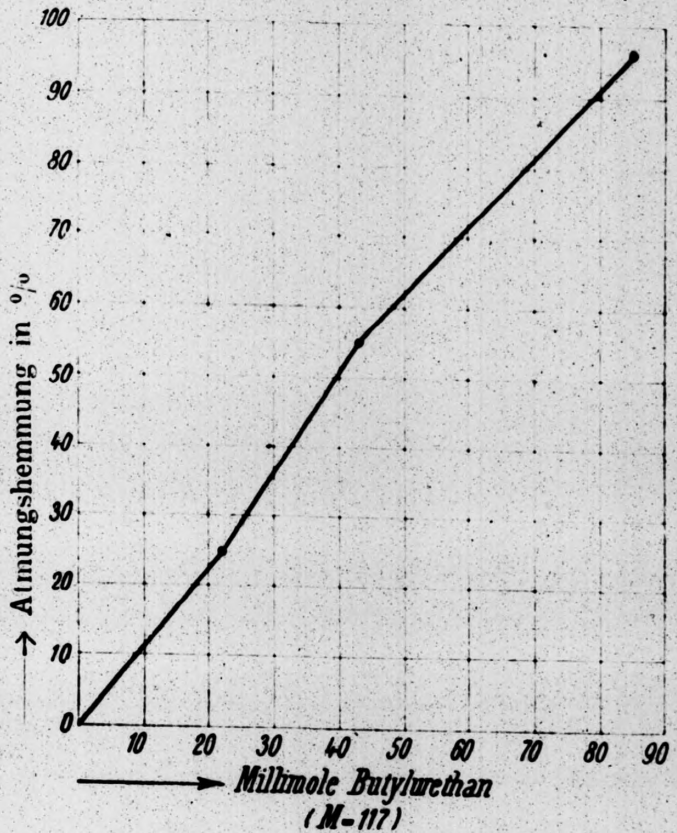


starke Wirkung kleiner Konzentrationen ist vielleicht bei Phenylurethan angedeutet, aber jedenfalls die Ausnahme, eine Tatsache, die für eine physikochemische Theorie dieser Wirkungen von Bedeutung ist.¹⁾

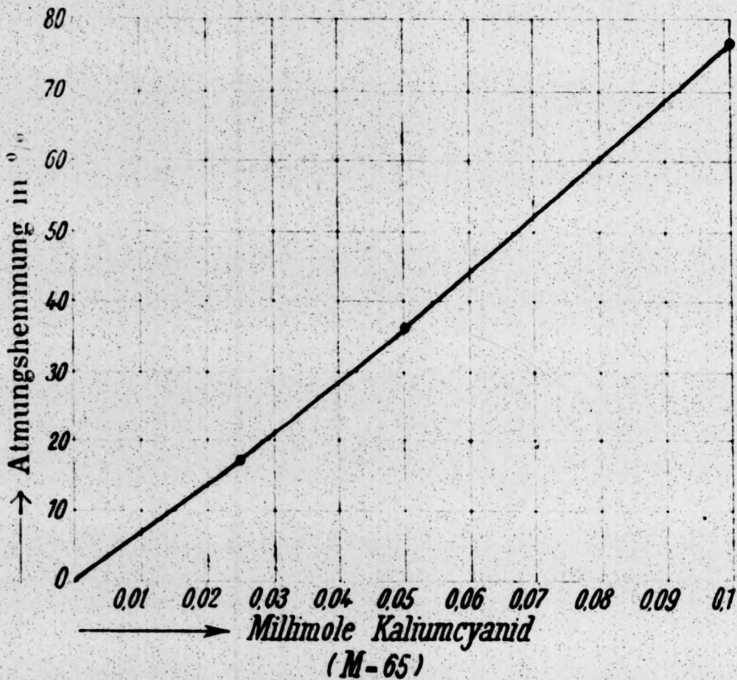
Proportionalität zwischen Konzentration und Wirkung ist, im Zusammenhang mit einer andern Tatsache, bis zu einem gewissen Grad merkwürdig; eine bestimmte Menge Urethan nämlich verhindert nicht eine bestimmte Menge Sauerstoff an der Reaktion in der Zelle, sondern im allgemeinen wird durch eine bestimmte Menge Urethan die Oxydationsgeschwindigkeit um einen bestimmten Bruchteil verlangsamt. Das läßt sich

¹⁾ So müßten beispielsweise Wirkungen, die der Konzentration an Oberflächen proportional sind, bei kleinen Konzentrationen relativ stärker sein, als bei großen. Vgl. z. B. Herbert Freundlich, Über die Adsorption in Lösungen, Zeitschrift f. physikalische Chemie, Bd. 57, S. 385 (1906).

demonstrieren durch Einwirkung gleicher Urethankonzentrationen auf verschieden stark atmende Zellen, wie sie uns, als schönes Vergleichsobjekt, in jungen und alten Gänseerythrocyten zur Verfügung stehen. Hemmte 0.6% Butylurethan die Atmung in alten Blutzellen um 70%, so hemmte es die Atmung in jungen Blutzellen, die doppelt so stark atmeten, um einen ganz ähnlichen Bruchteil. Darnach hätte man erwarten können, daß die Atmung, die unter dem Einfluß der Konzentration A einer Substanz auf die Hälfte gesunken ist, unter dem Einfluß der Konzentration 2 A auf die Hälfte von der Hälfte sinkt, d. h. auf ein Viertel. Unsere Kurven aber lehren, daß eine solche Vorstellung den Tatsachen nicht entspricht.



Weiter ergibt sich, daß wir keinen Grund haben zur Annahme von Schwellenwerten. Vermindert man die Konzentration einer hemmenden Substanz immer mehr, so findet man solange Hemmungen, bis man an der Grenze der Leistungsfähigkeit der Methode angelangt ist. Die Schwellenwerte, von denen in früheren Arbeiten gelegentlich die Rede war, wurden nur vorgetäuscht durch eine relativ grobe Methodik.¹⁾



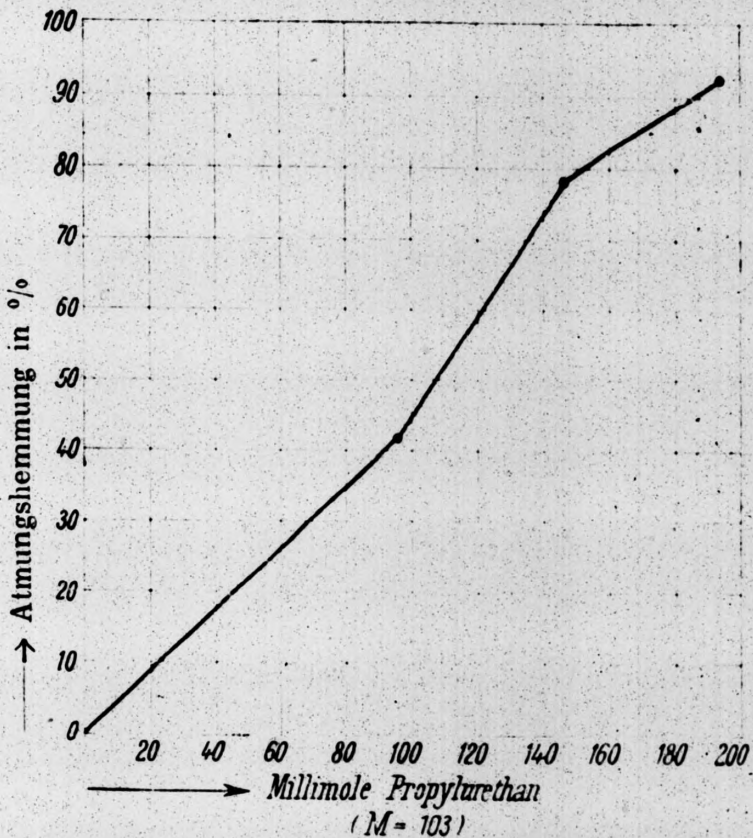
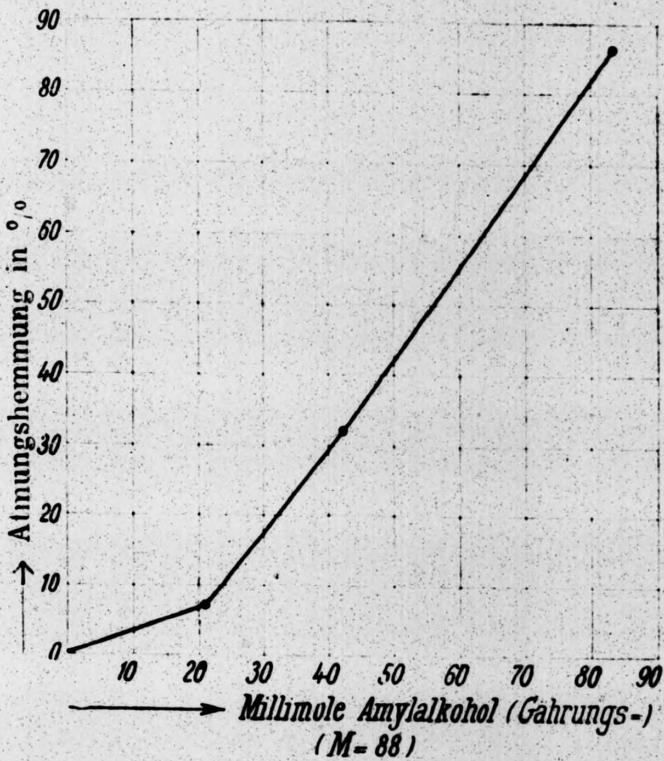
II.

Gleichzeitige Wirkung verschiedener Substanzen.

Auf Grund der Ergebnisse des vorigen Abschnittes wäre folgendes zu erwarten:

¹⁾ Ebenso würde, wenn in früheren Arbeiten von Wirkungslosigkeit die Rede war, jetzt von schwacher Wirkung zu sprechen sein. — Übrigens bezieht sich die Angabe, daß eine Substanz nicht wirkt, natürlich stets nur auf die angegebene Versuchszeit, und es ist wahrscheinlich, daß Zellen oder Organismen auf die Dauer eine erhebliche Abänderung ihres natürlichen Milieus nicht vertragen. Man denke z. B. an die Studien von Herbst über die zur Entwicklung der Seeigeleier notwendigen Stoffe. — Bezüglich der Additionen habe ich beiläufig erwähnt, daß sich die meisten Stoffe addieren (Diese Zeitschrift, Bd. 71, S. 479), und auch von Additionen zu Blausäure gesprochen. Daß solche vorkommen, ist aus dem Beispiel Phenylharnstoff ersichtlich. Verallgemeinert aber war diese Bemerkung unrichtig.

1. Die Kurven beider Substanzen sind geradlinig: genaue Addition. Wenn A 30% hemmt und B 30%, so hemmt A + B 60%.



2. Die Kurven einer Substanz oder beider Substanzen sind gekrümmt und beide Substanzen in solchen Mengen anwesend, daß sie die gleiche Hemmung bewirken: das Mittel aus den Hemmungen, die beide in doppelter Konzentration bewirken würden. Z. B. die Menge A einer Substanz hemmt 25%, die Menge 2 A 80%, die Menge B einer andern Substanz hemmt 25%, 2 B 75%, dann ist für die Gesamthemmung zu erwarten $\frac{80 + 75}{2} = 78\%$, und nicht etwa $25 + 25 = 50\%$.

Diese Überlegung gibt also eine sehr einfache Erklärung der gegenseitigen Verstärkung durch zwei verschiedene Substanzen.¹⁾

Aus den folgenden Zahlen geht hervor, daß die vorauszusehenden Wirkungen annähernd gefunden werden, wenn auch bei einigen Kombinationen die Verstärkungen größer sind, als man nach dem Gesagten erwarten sollte. — Die Addition zweier narkotisch wirkender Substanzen wurde von Claude Bernard²⁾ entdeckt. Solange man mit dem Begriff des Schwellenwertes operierte, war dieser Befund besonders für Substanzen, für die ein verschiedener Wirkungsmechanismus angenommen werden mußte, höchst auffallend. Nach unseren Überlegungen und Messungen jedoch heißt er nichts anderes, als daß zwischen den kombinierten Substanzen in der Zelle keine Reaktion stattfindet.

Die Konzentrationen sind wieder in Millimolen pro Liter angegeben, der entsprechende Prozentgehalt in Klammern beigefügt; die Atmungshemmungen sind umgerechnet auf die Atmung in 0,9%iger Natriumchloridlösung.

Diäthylharnstoff (symm.) + Äthylurethan.

	Hemmung in "
280 M. Äthylurethan (2,5%)	23
195 » Diäthylharnstoff (2,25%)	21
195 » + 280 M. Äthylurethan . . .	57

¹⁾ Vgl. indes auch Fühner, Münchner mediz. Wochenschrift, 1911. Nr. 14, wo für eine andere Kombination spezielle Erklärungen gegeben werden.

²⁾ Leçons sur les Anesthésiques et sur l'Asphyxie, S. 225—277. — Nußbaum, Intelligenzblatt für bayr. Ärzte, zitiert nach Cl. Bernard. — Overton. Studien über die Narkose. S. 143.

Phenylharnstoff + Butylurethan (iso).

	Hemmung in %
30 M. Butylurethan (0,35%)	27
18 Phenylharnstoff (0,25%)	37
30 » Butylurethan + 18 M. Phenylharnstoff	87

Äthylurethan + Butylurethan.¹⁾

340 M. Äthylurethan (3%)	29
30 » Butylurethan (0,35%)	31
340 » Äthylurethan + 30 M. Butylurethan	85

Formaldehyd + Butylurethan.

1 M. Formaldehyd (0,003%) ²⁾	36
30 » Butylurethan (0,35%)	33
1 » Formaldehyd + 30 M. Butylurethan	64

Butylurethan + Propylurethan.

30 M. Butylurethan (0,35%)	35
97 » Propylurethan (1,0%)	39
30 » Butylurethan + 97 M. Propylurethan	97

Amylalkohol³⁾ + Äthylurethan.

340 M. Äthylurethan (3%)	35
42 » Amylalkohol (0,37%)	47
340 » Äthylurethan + 42 M. Amylalkohol	91

Wir gehen jetzt über zu den Blausäureversuchen und geben zunächst eine Reihe, die bei ganz ähnlicher Anordnung erhalten wurde, wie die vorstehende Kombinationsreihe.

Äthylurethan + KCN.

	Hemmung in %
340 M. Äthylurethan (3%)	25
0,05 » Kaliumcyanid	35
340 » Äthylurethan + 0,05 M. Kaliumcyanid	40

¹⁾ Im methodischen Teil genau beschrieben.

²⁾ In Wirklichkeit ist die Formaldehydkonzentration in der umspülenden Flüssigkeit etwas geringer, weil bei der in dieser Arbeit geübten Waschmethode auch beim dritten Waschen noch etwas Formol von den Zellen aufgenommen wird. Die Exaktheit des Additionsversuchs wird dadurch nicht beeinträchtigt.

³⁾ Gärungs-

		Hemmung in %
113	M. Äthylurethan (1%)	7
0,05	» Kaliumcyanid	30
113	» Äthylurethan + 0,05 M. Kaliumcyanid . .	25

Propylurethan + KCN.

29	M. Propylurethan (0,3%)	13
0,05	» Kaliumcyanid	38
29	» Propylurethan + 0,05 M. Kaliumcyanid .	38
97	M. Propylurethan (1%)	36
0,05	» Kaliumcyanid	57
97	» Propylurethan + 0,05 M. Kaliumcyanid .	56

Butylurethan (iso) + KCN.

30	M. Butylurethan (0,35%)	34
0,05	» Kaliumcyanid	35
30	» Butylurethan + 0,05 M. Kaliumcyanid . .	39
30	M. Butylurethan (0,35%)	32
0,05	» Kaliumcyanid	35
30	» Butylurethan + 0,05 M. Kaliumcyanid . .	31
8,5	M. Butylurethan (0,1%)	8
0,05	» Kaliumcyanid	43
8,5	» Butylurethan + 0,05 M. Kaliumcyanid . .	17

Methylurethan + KCN.

666	M. Methylurethan (5%)	0
0,05	» Kaliumcyanid	37
666	» Methylurethan + 0,05 M. Kaliumcyanid .	19

Phenylharnstoff + KCN.

7	M. Phenylharnstoff (0,1%)	20
0,05	» Kaliumcyanid	49
7	» Phenylharnstoff + 0,05 M. Kaliumcyanid .	65
22	M. Phenylharnstoff (0,3%)	56
0,05	» Kaliumcyanid	38
22	» Phenylharnstoff + 0,05 M. Kaliumcyanid .	77

Aus den angeführten Beispielen sehen wir, daß von einer Addition der Blausäure keine Rede ist. Nur bei Phenylharnstoff ist die Kombination deutlich wirksamer, als die Komponenten allein; bei den übrigen Stoffen überschreitet die Kombinationshemmung kaum die Hemmung einer Komponente und in 2 Anordnungen, 0,1% Butylurethan und 5% Methylurethan, ist die Kombinationshemmung geringer, als die Blausäurehemmung allein. Diese Fälle sind besonders instruktiv, denn sie beweisen, daß es sich wirklich um eine Hemmung der Blausäurewirkung handelt, während die übrigen Kombinationen offen lassen, ob nicht etwa die Blausäure die Urethanwirkung hemmt. Selbstverständlich aber schließen sie nicht aus, daß gleichzeitig die Urethanwirkung durch die Blausäure abgeschwächt wird, daß wir es also mit einer gegenseitigen Verdrängung zu tun haben. Versuche, die ich nach dieser Richtung angestellt habe, verliefen allerdings stets negativ, kombinierte ich stark hemmende Dosen von Urethan mit schwach hemmenden Dosen Blausäure, so sah ich bisher nie eine geringere Hemmung als durch Urethan allein.

Die Tatsache, daß die Hemmung bei Kombination zweier hemmenden Substanzen geringer sein kann, als die Hemmung durch eine Komponente allein, schien mir interessant genug, um nach weiteren derartigen Beispielen zu suchen. In der Tat stößt man auf dieses Verhalten häufiger, wenn man größere Blausäurekonzentrationen wählt. Das ist, ohne Beeinträchtigung der Genauigkeit der Bestimmungen, möglich, wenn man die Versuchszeiten entsprechend ausdehnt.

In der folgenden Tabelle sind eine Anzahl derartiger Kombinationswirkungen zusammengestellt; die Daten zeigen, daß die Oxydationsgeschwindigkeit in blausäurebeladenen Zellen durch Urethane oder Alkohole um 20 bis 50% gesteigert werden kann.

(Angegeben sind die Konzentrationen wieder in Millimolen; die Atmungsgrößen diesmal direkt in Millimetern Wasser, die dem Sauerstoffverbrauch proportional sind;¹⁾ 0,1 Millimol

¹⁾ Das Genauere siehe Methodik.

KCN pro Liter hemmt etwa die Atmung von 75—80⁰/₀, deshalb betrug die Versuchsdauer 6 Stunden bei 29⁰.)

		Steigerung	
	0,1 M. Kaliumcyanid	84	} 48 ⁰ / ₀
260	» Methylurethan + 0,1 M. Kaliumcyanid	124	
	0,1 » Kaliumcyanid	113	} 33 ⁰ / ₀
0,1	» » + 113 M. Äthylurethan (1 ⁰ / ₀)	151	
	0,1 »	75	} 44 ⁰ / ₀
0,1	+ 226 M. Äthylurethan (2 ⁰ / ₀)	108	
	0,1 »	68	} 34 ⁰ / ₀
0,1	+ 39 M. Propylurethan (0,4 ⁰ / ₀)	91	
	0,1 »	109	} 31 ⁰ / ₀
0,1	+ 17 M. Butylurethan (0,2 ⁰ / ₀)	143	
	0,1 »	85	} 39 ⁰ / ₀
0,1	+ 17 M. Butylurethan (0,2 ⁰ / ₀)	118	
	0,1 »	68	} 37 ⁰ / ₀
0,1	+ 54 M. Butylalkohol (0,4 ⁰ / ₀)	93	
	0,1 »	63	} 51 ⁰ / ₀
0,1	+ 46 M. Amylalkohol (iso) (0,4 ⁰ / ₀)	95	
	0,1 » »	109	} 14 ⁰ / ₀
1)	+ 70 M. Äthylalkohol (0,32 ⁰ / ₀)	124	
	+ 43 » Butylalkohol (0,32 ⁰ / ₀)	160	
	+ 18 » Amylalkohol (0,16 ⁰ / ₀)	172	
	0,1	126	
	0,1 » + 107 M. Methylurethan (0,8 ⁰ / ₀)	128	—
	0,1 » + 78 » Propylurethan (0,8 ⁰ / ₀)	159	26 ⁰ / ₀

Besonders die beiden letzten Versuche sollen zeigen, daß äquimolekulare Mengen von Alkoholen oder Urethanen keineswegs gleich stark auf die Blausäurehemmung wirken. — Die Durchsicht der Zahlen ergibt ferner, daß die Steigerung der Atmung mit wachsenden Konzentrationen, z. B. von Amylalkohol, wieder abnimmt. Das wird dann eintreten, wenn die Eigenhemmung des zugefügten Alkohols größer wird, als die Beeinträchtigung der Blausäurewirkung.

1) Im methodischen Teil genau beschrieben.

Methode.

Der wesentlichste Unterschied gegen frühere Versuche¹⁾ bestand darin, daß die Suspension der Zellen weniger dicht war. Da trotzdem, um die Ausschläge nicht zu verkleinern, die gleiche Menge Zellen benutzt wurde, so war das Gesamtvolumen größer, etwa 10 ccm (gegen 3 ccm früher). Die Suspensionsflüssigkeit war eine 0,9%ige Natriumchloridlösung, der in ihr gelöste Sauerstoff kam, im Verhältnis zum Hämoglobinsauerstoff, jetzt in Betracht. — Die Suspensionen wurden stets bei der Temperatur des Atmungsversuchs, 29°, an der Luft gesättigt. Nach einer passenden Versuchszeit, in der Regel 2 Stunden und bei den Versuchen mit $\frac{1}{10000}$ -n-KCN nach 5 bis 6 Stunden, wurden sie unter 3 ccm NH_3 -Saponin²⁾ geschichtet³⁾ in Gläser von ca. 50 ccm. Hierauf wurde am Haldane-Barcroft'schen Manometer⁴⁾ die Druckverminderung bestimmt, die beim Schütteln bis zur Sättigung auftrat. In einer Probe, die nicht geatmet hat, sondern sofort nach der Sättigung mit Cyankali vergiftet und dann an dem Manometer gesättigt wird, tritt eine Druckverminderung auf, die herrührt von folgenden Faktoren: 1. Sauerstoff und Stickstoff, die bei der Bestimmungstemperatur, ca. 15—19°, sich in der Flüssigkeit, die ja bei 29° gesättigt ist, lösen, werden physikalisch absorbiert: 2. das Hämoglobin bindet bei anderer Temperatur und in anderem Milieu (die Blutkörperchen werden durch das Saponin gelöst)

¹⁾ O. Warburg, Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 452; Bd. 70, S. 413; Bd. 71, S. 479.

²⁾ 125 ccm CO_2 -freie $\frac{n}{10}$ -NaOH; 125 ccm Wasser; 0,7 g NH_4Cl ; 1,5 g Saponin; 1 ccm 20%ige alkohol. Lösung von Phenylurethan.

³⁾ Die 10 ccm fassenden Atmungsgläschen haben auf der einen Seite einen eingeriebenen Glasstopfen, auf der andern Seite einen Hahn mit Kapillare; zum Unterschichten wird die Kapillare in das Bestimmungsglas in NH_3 -Saponin gestellt und der Hahn langsam geöffnet, nachdem der Glasstopfen gelüftet ist.

⁴⁾ Auf Rat von Brodie besteht die Flüssigkeit im Manometer aus: 500 ccm Wasser; 23 g NaCl; 5 g Natr. choleinic. Merck; etwas Thymol. Das Rezept verdanke ich Herrn Prof. Wolf aus New York.

andere Mengen Sauerstoff;¹⁾ 3. Kohlensäure wird aus dem Schüttelglas absorbiert. Da diese Faktoren nur teilweise berechenbar sind, so bestimmte ich die Absorption der maximal gesättigten Probe und zog sie von der Probe, die geatmet hatte, ab.

Um eine richtige Kontrolle zu erhalten, muß man die maximal gesättigte Suspension sofort mit Cyankali vergiften, da die Atmung während der Sauerstoffbestimmung, nämlich in der Zeit vom Einfüllen bis zum Lakieren,²⁾ in Betracht kommt. Wenn es sich um absolute Werte handelt, muß man auch die Suspensionen, die geatmet haben, vor der Bestimmung vergiften. Das tat ich in der Regel nicht, weil es mir nur darauf ankam: Wievielmahl mehr atmet die Suspension a als die Suspension b? Für diese Frage ist die absolute Versuchszeit ganz gleichgültig, es kommt nur darauf an, daß beide Suspensionen gleich lange atmen.

Berechnung: Sie ist dieselbe wie früher,³⁾ für sehr große Ausschläge werden Korrekturen wegen der Abnahme des Sauerstoffdrucks angebracht. Da stets gleiche Blutmengen für einen Versuch verwendet wurden und Atmungs- und Bestimmungsgläschen gleich groß waren (Atmungsgläschen 10 cm. Bestimmungsgläschen 50 cm), so stehen die korrigierten Druckverminderungen direkt im Verhältnis der Oxydationsgrößen.

Die Abmessung des Blutes ist am genauesten, wenn man die Zellen im defibrinierten Blut abmißt. Es wurden z. B. in 4 Röhrchen gleiche Mengen defibriniertes Gänseblut verteilt, bei stark anämischen Tieren,⁴⁾ wie sie meist verwendet werden.

¹⁾ Barcroft und Camis, Blood Dissociation Curve, Journal of Physiology, Bd. 39, S. 118. — Barcroft und Hill, Oxyhämoglobin, Bd. 39, S. 411. — Barcroft und King, Dissociation Curve of Blood, Bd. 39, S. 374.

²⁾ Auch nach dem Lakieren wird Sauerstoff verbraucht, wahrscheinlich, weil die Kerne noch teilweise intakt sind. Diese Atmung zerstörter Zellen ist aber bei kleiner Konzentration der Zellen sehr gering (Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 413) und kommt deshalb hier, bei einigermaßen raschem Arbeiten, nicht in Betracht.

³⁾ Das spezifische Gewicht der Manometerflüssigkeit war 1,034, oder 10000 mm etwa gleich einer Atmosphäre.

⁴⁾ deren Blut sehr zellarm ist.

je 8–9 ccm, dann zentrifugiert, das Serum abgehoben, 3mal mit den Lösungen gewaschen und quantitativ in die Atmungsgläschen übergespült, so daß diese halb voll waren. Nun wurden Atmungsgläschen und Lösungen 10 Minuten in den Thermostaten bei 29° gehängt, dann alles maximal gesättigt, aufgefüllt und verschlossen. Für ganz genaue Bestimmungen wurden die Röhrchen, sofort nachdem sie gesättigt und gefüllt waren, bei offenem Hahn in Eis gelegt, damit der Inhalt des Röhrchens, das zuletzt gesättigt war, nicht kürzer atmete als der des zuerst gesättigten. Dann wurden alle 4 gleichzeitig in den Thermostaten gelegt.

Genauigkeit: Alles wurde so eingerichtet, daß der Ausschlag der Suspension in NaCl 100–150 mm betrug. Rechnet man den Gesamtfehler (inbegriffen Abmessung des Blutes, Umfüllen usw.) hoch auf 5 mm, so ergibt sich daraus der mögliche Irrtum für die verschiedenen Versuchsanordnungen. Man sieht, daß die Ungenauigkeit für kleine Hemmungen sehr groß wird. Das gilt besonders für die Kurven, und soll davor warnen, den Gang der Kurven schon jetzt für eine mathematische Behandlung zu benutzen.¹⁾ Übrigens darf man zur Ausmittlung von Kurvenpunkten nicht etwa verschiedenes Material benutzen: gleiche Konzentrationen einer Substanz wirken auf verschiedenes Material nicht immer gleich stark. Deshalb sind stets nur 3 Punkte als Resultate eines Versuches angegeben.

Beschreibung eines Additionsversuchs: Es wurden je 100 ccm einer 6%igen Äthylurethanlösung und einer 0,7%igen Butylurethanlösung²⁾ in 0,9%igem NaCl hergestellt. Dann wurden 50 ccm der Äthylurethanlösung mit 50 ccm der Butylurethanlösung vermischt; ferner je 50 ccm der Urethanlösungen mit 50 ccm Wasser. Somit waren 3 Lösungen vorhanden: 3%iges Äthylurethan, 0,35%iges Butylurethan und 3%iges Äthyl-, 0,35%iges Butylurethan. Als Kontrolle diente eine 0,9%ige Natriumchloridlösung. Die Röhrchen wurden in der angegebenen Weise hergestellt und blieben 1½ Stunden bei 29° im Wasser-

¹⁾ Auch deshalb, weil der Gang der Kurven nicht stets ganz gleich gefunden wird.

²⁾ Das Kahlbaumsche Präparat aus Wasser umkrystallisiert, 20 g aus 400 ccm Wasser.

thermostaten. Die Temperatur bei der O₂-Bestimmung war 17°. Die Druckverminderungen beliefen sich

in NaCl	auf 166 korr.
» 3 ⁰ / ₁₀₀ igem Äthylurethan »	118 »
» 0,35 ⁰ / ₁₀₀ igem Butylurethan »	115 »
» der Mischung »	24 »

Beschreibung eines Additionsversuchs mit Blausäure: Es wurden hergestellt eine 0,32⁰/₁₀₀ige Butylalkohol-,¹⁾ eine 0,16⁰/₁₀₀ige Amylalkohollösung,²⁾ eine 0,32⁰/₁₀₀ige Äthylalkohollösung in 0,9⁰/₁₀₀igem NaCl; außerdem eine 0,9⁰/₁₀₀ige NaCl-Lösung. Von diesen 4 Flüssigkeiten wurden in 4 trockne Kolben je 100 ccm genau abgemessen: dann in jeden Kolben 2 ccm ⁿ/₂₀₀-KCN³⁾ genau abgemessen. Waschen und Behandlung der Zellen wie im vorigen Versuch. Nach 5 Stunden bei 29° waren die korr. Druckverminderungen:

Bestimmungs- temperatur 15°	{	in ¹ / ₁₀₀₀₀ -n-KCN	109
		» + 0,32 ⁰ / ₁₀₀ Butylalkohol .	160
		» + 0,16 ⁰ / ₁₀₀ Amylalkohol .	172
		» + 0,32 ⁰ / ₁₀₀ Äthylalkohol .	124

Auf die Herstellung genau gleicher Blausäurekonzentrationen in den 4 Kolben muß deshalb große Sorgfalt verwendet werden, weil bei großen Hemmungen kleine Unterschiede in der Konzentration schon sehr viel ausmachen.

Die Kosten dieser Arbeit wurden teilweise aus einem Stipendium bestritten, das mir von der Jagor-Stiftung in Berlin zur Verfügung gestellt war.

¹⁾ Butylalkohol (iso) Kahlbaum.
²⁾ Der reinste Gärungsamylalkohol von Merck wurde destilliert. Benutzt wurde nur Flüssigkeit, die konstant innerhalb eines Grades übergegangen war.
³⁾ Die Stamm-KCN-Lösung war ¹/₁₀-n. und nach Gay-Lussac titriert.