

**Fermentstudien:**  
**I. Bestimmung von Fermentwirkungen mit Hilfe  
des Interferometers.**

**I. Mitteilung.**

**Die Anwendung der «interferometrischen Methode» zum  
Studium der Abwehrfermente.**

Von

**Paul Hirsch.**

---

Mit zwei Tafeln und einer Abbildung im Text.

---

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Jena.)  
(Der Redaktion zugegangen am 8. Mai 1914.)

---

Durch die bekannten Arbeiten von Emil Abderhalden wissen wir, daß der tierische Organismus nach parenteraler Zufuhr körperl. resp. blutfremder Substanzen mit der Mobilmachung von Abwehrfermenten antwortet. Die Nutzenanwendung dieser durch mannigfache Experimente erwiesenen Tatsachen gipfelt u. a. in dem von Abderhalden angegebenen biologischen Nachweis der Schwangerschaft und der Diagnose von bösartigen Geschwülsten. Zum Nachweis derartiger Abwehrfermente standen bisher die zwei von Abderhalden angegebenen Methoden zur Verfügung, einmal das sogenannte Dialysierverfahren, zum anderen die «optische Methode». Diese beiden Methoden gestatten hauptsächlich den qualitativen Nachweis der Abwehrfermente. Zwar erlaubt die «optische Methode» durch Verfolgung der Schnelligkeit, mit der eine Drehungsänderung eintritt, auch eine gewisse Feststellung der Intensität bezw. der Menge der Abwehrfermente. Auch das Dialysierverfahren gestattet, aus der Farbe der Ninhydrinprobe unter Umständen Schlüsse auf die Menge der Abwehrfermente zu ziehen. Für manche biologische Fragestellung erschien mir jedoch eine genaue quantitative

Methode zur Verfolgung der Abwehrfermente bezw. der Intensität ihrer Wirkung unbedingt erforderlich. Auf der Suche nach einer derartigen Methode fand ich in dem Flüssigkeitsinterferometer ein geeignet erscheinendes Instrument, das sich zu einer derartigen Methode anwenden läßt.

Es sei gleich eingangs erwähnt, daß auch auf diesem Wege das Auftreten und die Spezifität von Abwehrfermenten nachgewiesen werden konnte. Es bringt somit auch die «interferometrische Methode» den Beweis der Richtigkeit der Abderhaldenschen Anschauungen.

Das Löwische Flüssigkeitsinterferometer ist ein Instrument, das ermöglicht, in kurzer Zeit Konzentrationsänderungen in Flüssigkeiten mit größter Genauigkeit festzustellen und quantitativ zu bestimmen. Ein derartiger Apparat stand uns durch die Freigebigkeit der Firma Carl Zeiss-Jena zur Verfügung. Ehe ich auf die Konstruktion des Apparates näher eingehe, will ich ganz kurz die Grundlagen anführen, auf denen ich die im weiteren angegebene Methode zur quantitativen Verfolgung der Abwehrfermentwirkung aufgebaut habe.

Läßt man z. B. Serum von Schwangeren auf Placentagewebe einwirken, so wird dasselbe zu Peptonen abgebaut, die sich, da Peptone lösliche Körper sind, in dem Serum lösen. Nimmt man einmal Serum allein, zum anderen Serum, das längere Zeit auf Placentagewebe eingewirkt hat, so sind zwischen beiden Unterschiede in der Konzentration vorhanden, die man mit Hilfe des Interferometers quantitativ bestimmen kann.

Ehe ich auf die eigentlichen Versuche und ihre Resultate eingehe, will ich ganz kurz das Prinzip und die Einrichtung des Interferometers beschreiben, da ich wohl annehmen kann, daß dasselbe an dieser Stelle noch nicht bekannt ist.

Das Löwische Flüssigkeitsinterferometer ist entstanden aus dem Interferometer von Lord Rayleigh,<sup>1)</sup> das dieser zur Bestimmung des Lichtbrechungsvermögens von Edelglasen

<sup>1)</sup> F. Haber und F. Löwe, Ein Interferometer für Chemiker nach Rayleighschem Prinzip. Zeitschr. f. angew. Chem., Bd. 23, S. 1393—1398 (1910).

verwendet hatte. Bei den Messungen mit Hilfe des Wasserinterferometers führt man Differenzmessungen aus; d. h. man mißt das Wandern von Interferenzstreifen, das durch den Unterschied der Lichtbrechung der zu untersuchenden Probe und einer Vergleichslösung hervorgerufen wird. Bei dem Interferometer von Raileigh (s. Abbild. 1) geht ein aus einem Kollimator austretendes Lichtbündel durch zwei parallele gleichbreite Spaltblenden hindurch in ein Fernrohr und erzeugt eine Fraunhofersche Beugungserscheinung; dieselbe besteht aus einem weißen Bilde des Kollimatorspaltes, in dem das sogenannte Maximum nullter Ordnung und symmetrisch dazu angeordnete Beugungserscheinungen, Beugungsspektren, auftreten, die durch sehr schmale Minimastreifen getrennt sind. Setzt man zwischen Kollimator und Fernrohr eine Doppelkammer, so verändert sich die Erscheinung nicht, wenn beide

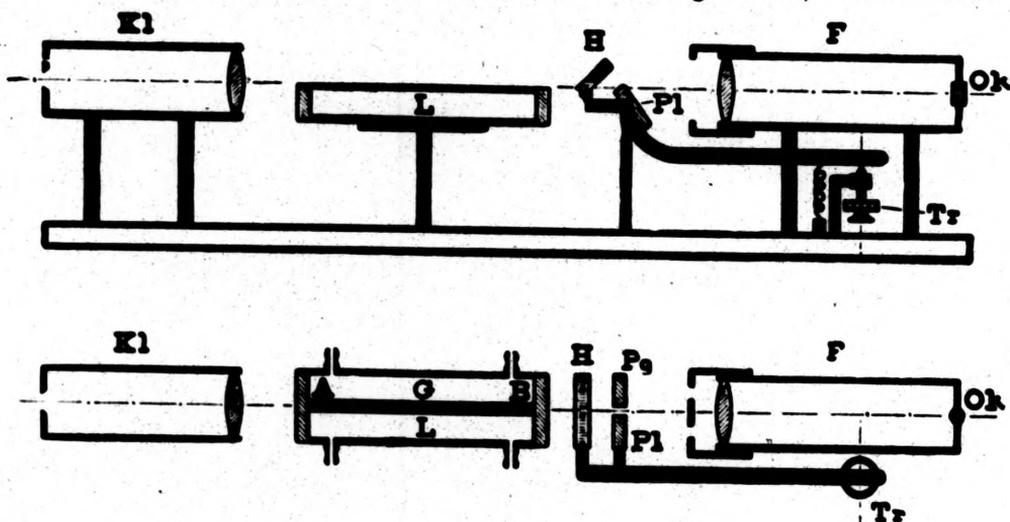


Abb. 1.

Laboratoriums-Gas-Interferometer im Auf- und Grundriß  
(etwa  $\frac{1}{30}$  natürl. Größe).

Das aus dem Kollimator Kl ausgetretene parallelstrahlige Bündel geht zum Teil durch die Kammern L, G und die Kompensatorplatten Pl, Pg zum Teil über den Kammern hin durch die Hilfsplatte H in das Fernrohr F, das mit einem Zylinderokular Ok ausgerüstet ist. Tr ist die 100teilige Trommel der Mikrometerschraube des Kompensators. G bezeichnet die Gaskammer, die mit der Luftkammer L zusammengelötet ist. Pg ist die feste Platte des Kompensators. Die Doppelblende ist auf das Objektivende des Fernrohres aufgeschoben. Die Zylinderachse steht parallel der Längsrichtung des Spaltes und der Doppelblende.

Kammern mit gleicher Substanz gefüllt sind. Sind die Substanzen verschieden, d. h. hat die eine Substanz eine andere Lichtbrechung als die zweite, so ist die optische Weglänge in beiden Kammern verschieden. Die Interferenzerscheinung ist gegen ihre bisherige Lage verschoben. Die Hauptsache an diesem Interferometer ist eine Einrichtung, durch die es gelingt, eine Interferenzerscheinung und zwar eine unveränderliche, normale Interferenzerscheinung, unabhängig von der durch verschiedene Lichtbrechung erzeugten verschobenen Interferenzerscheinung sichtbar zu machen, also ein unveränderliches Vergleichsspektrum. Es stellt hierdurch das unveränderliche System eine ideale Nullmarke dar: Durch Drehen der Schraube eines Kompensators kann man leicht die zwei obenerwähnten schwarzen Streifen, die das Maximum nullter Ordnung (das Weiße) begrenzen, in dem oberen und unteren Bilde genau auf Koinzidenz einstellen. Durch Ablesung der hierzu notwendig gewesenem Trommelumdrehung kann man die Unterschiede in dem Lichtbrechungsvermögen der beiden verglichenen Substanzen feststellen.

Dieses sogenannte Laboratoriumsinterferometer ist speziell für Gasuntersuchungen gebaut. Aus ihm entstand durch Anwendung des Prinzips der Autokollimation (d. h. durch Vereinigung von Kollimator und Fernrohr in einem Teile) das tragbare Flüssigkeitsinterferometer.<sup>1)</sup>

Auf die nähere Konstruktion des Interferometers soll nicht eingegangen werden (s. Tafel 2., Abbild. 1 u. 2). Es sei nur erwähnt, daß zur Aufnahme der beiden zu untersuchenden resp. zu vergleichenden Flüssigkeiten Kammern (s. Tafel 3., Abbild. 3) dienen, welche zwecks Temperatenausgleiches in einem Temperierbad angeordnet sind. Die zu beobachtenden Erscheinungen sind die gleichen, wie bei dem eingehender beschriebenen Interferometer von Rayleigh. Sind die beiden Hälften der Doppelkammer mit Flüssigkeiten gleicher Konzentrationen gefüllt, so zeigen beide Interferenzfiguren das gleiche Aussehen (Nullage), enthält jedoch die eine Kammer eine

<sup>1)</sup> F. Löwe, Ein tragbares Interferometer für Flüssigkeiten und Gase. Zeitschr. f. Instrumentenkunde, Bd. 30, S. 321—329 (1910).

Flüssigkeit von größerer Konzentration, so wird hierdurch ein Unterschied in der sogenannten optischen Weglänge bedingt und demzufolge sind beide Interferenzbilder verschieden. Wenn man nun durch langsame Drehung der einen Kompensatorplatte mit Hilfe einer mit Teilung versehenen Mikrometerschraube den Unterschied der optischen Weglänge wieder ausgleicht, so nehmen allmählich beide Interferenzbilder wieder gleiche Lage ein. Das Messen mit dem Kompensator stellt also eine Nullmethode dar, die erfahrungsgemäß bei den verschiedensten Beobachtern zu gleichmäßigen und genauen Resultaten führt, jeder subjektive Beobachtungsfehler aber ausgeschaltet wird.

Die Doppelkammern haben verschiedene Länge: 5, 10, 20 und 40 mm.

Praktisch gestaltet sich eine Untersuchung auf Anwesenheit von Abwehrfermenten z. B. bei Schwangerschaft wie folgt: 2 Zentrifugiergläschen, die sorgfältig verschlossen werden können, werden mit Serum bzw. mit Serum plus Placentagewebe beschickt. Beide Röhrchen werden genau 24 Stunden lang bei Brutschranktemperatur aufgehoben. Nach dieser Zeit werden beide Röhrchen zentrifugiert und dann die beiden klaren Sera interferometrisch untersucht. Liegt Schwangerschaft vor, so verursachen die Schutzfermente einen Abbau, die gebildeten löslichen Peptone gehen in dem Serum in Lösung und die Größe der dadurch bedingten Konzentrationsänderung kann mit Hilfe des Interferometers quantitativ bestimmt werden.<sup>1)</sup>

Die Hauptschwierigkeiten lagen darin, daß es sehr

<sup>1)</sup> Zunächst versuchte ich das Dialysat (Abderhaldensches Dialysierverfahren) mit Hilfe des Interferometers zu untersuchen und die Menge der dialysierten Stoffe zu bestimmen. Dieser Weg führte jedoch nicht zum Ziele. Das Serum an sich enthält schon dialysable Stoffe (Salze, Zucker usw.), die schon zu Verschiebungen der Interferenzbilder bei Benutzung von destilliertem Wasser als Vergleichsflüssigkeit führten. Eventuelles Ausschalten dieser «Konzentrationsänderungen» durch Kontrollen ist unmöglich, da praktisch zwei Dialysierhülsen mit genau gleicher quantitativer Durchlässigkeit für dialysable Produkte nicht herzustellen sind. (Unmöglichkeit einer quantitativen kolorimetrischen Methode auf diesem Wege.)

schwer war, für diese Versuche geeignete Organpräparate zu erhalten.

Man mußte von einem derartigen Präparat verlangen, daß es erstens trocken, zweitens vollständig frei von löslichen Bestandteilen und vor allen Dingen haltbar ist. Die erste Bedingung, daß die Präparate trocken sein müssen, ist deshalb notwendig, da die geringste Feuchtigkeit eine Verdünnung des Serums verursacht, die im Interferometer nachweisbar ist und dadurch zu entgegengesetzten Ausschlägen führt.

Als Kriterium zur zweiten Anforderung wurde die Ninhydrinprobe benützt. Es wurde von einem Präparat verlangt, daß 5 ccm Kochwasser mit 2 ccm einer 1%igen Ninhydrinlösung keine Farbreaktionen mehr geben, daß das Kochwasser bei der Untersuchung im Interferometer gegen destilliertes Wasser als Vergleichsflüssigkeit keine Verschiebung der Interferenzfiguren zeigt und schließlich daß 0,5 g an 5 ccm physiologische Kochsalzlösung keine interferometrisch nachweisbaren Produkte abgeben.

Nach langen Versuchen gelang es, derartige Präparate zu erhalten. So verfüge ich u. a. über ein Placentapräparat, das seit der vor einem Vierteljahr erfolgten Darstellung immer noch allen Anforderungen genügt. Die Mengen dieses Präparates, welche zu je einem Versuch benutzt werden, sind auf der analytischen Wage abgewogen und in zugeschmolzenen braunen Glasröhrchen steril aufbewahrt.<sup>1)</sup> Selbstverständlich sind auch die notwendigen Kontrollversuche angestellt worden.

Erstens wurde zunächst geprüft, ob die verwendeten Organe an sich bei 24stündigem Aufenthalt im Brutschrank keine Peptone resp. keine sonstigen löslichen Stoffe abgeben. Es wurde jedesmal ein Kontrollversuch mit der gleichen Organmenge und physiologischer Kochsalzlösung angestellt. Beim Vergleich mit unter gleichen Bedingungen aufgehobener physiologischer Kochsalz-

---

<sup>1)</sup> Im Einverständnis mit dem Direktor des Pharmakologischen Instituts Herrn Professor Dr. Kionka bin ich bereit, an Interessenten Organproben, soweit verfügbar, abzugeben. Jedes Organ erfordert eine etwas modifizierte, sehr sorgfältige, aber nicht schwierige Zubereitung. Die genaueren Angaben werden in Kürze mitgeteilt werden.

lösung wurde nie eine Verschiebung der Interferenzfiguren beobachtet, mithin erwiesen sich also die Organe als einwandfrei.

Zweitens wurden auch zwei gleiche Mengen gleichen Serums 24 Stunden lang im Brutschrank aufbewahrt. Auch hier zeigte die Interferometer-Untersuchung keinerlei Unterschiede, ebenso wenig waren Unterschiede zwischen bei Brutschranktemperatur aufbewahrttem Serum und solchem, das bei gewöhnlicher Temperatur gehalten wurde, festzustellen.

Die Ausschläge in Trommelteilen sind sehr beträchtliche. Aus einer großen Anzahl von Untersuchungen mit Schwangerenserum<sup>1)</sup> seien nur zwei angeführt.

## R. A. 14. XII. 13.

Rohr 1 : 3	ccm Serum	allein	
» 2 : 3	»	»	+ 0,1 g Placenta
» 3 : 3	»	»	+ 0,2 »
	20 mm-Kammer		5 mm-Kammer
Rohr 1 : 2	595	Trtle.-Diff. <sup>2)</sup>	140
» 1 : 3	1442	»	340

## H. S. 14. XII. 13.

Rohr 4 : 3	ccm Serum	allein	
» 5 : 3	»	»	+ 0,1 g Placenta
» 6 : 3	»	»	+ 0,2 »
	20 mm-Kammer		5 mm-Kammer
Rohr 4 : 5	746	Trtle.-Diff.	186
» 4 : 6	2184	»	546

Bei Anwendung von Normalserum wurde nie irgend eine Verschiebung der Interferenzfiguren beobachtet. Auch nicht um eine Spur waren die zwei schwarzen Trennungslinien verschoben. Es seien ganz kurz einige Daten über die Genauigkeit des Interferometers angegeben.

Es wurden 0,1 g Placentapepton «Höchst» in 20 ccm Wasser gelöst. Von dieser 0,5%igen Stammlösung wurden 0,05- und 0,005%ige Lösungen hergestellt. Diese Lösungen wurden mit destilliertem Wasser als Vergleichsflüssigkeit interferometrisch untersucht.

<sup>1)</sup> Die Sera verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Dr. Henkel, Direktor der Universitätsfrauenklinik, Jena.

<sup>2)</sup> Trtle.-Diff. = Trommelteile-Differenz, vgl. weiter unten.

Nachstehende Tabelle gibt die Resultate an:

Temperatur des Temperierbades 18,7°.		
	20 mm-Kammer	5 mm-Kammer
0,5%	1303	326
0,05%	122	32
0,005%	12	3

Die Zahlen bedeuten die Anzahl der Trommelteile, die durch das wegen der Verschiebung der Interferenzfiguren bedingte Drehen der Kompensatorschraube als Ausschlag abgelesen wurden (Trommelteile-Differenz).

Ordnet man die Zahlen graphisch in einem Koordinatensystem an, so verläuft die Kurve, abgesehen von einem kleinen Meßfehler von drei Trommelteilen, sowohl für die 20 mm- als für die 5 mm-Kammer in einer geraden Linie. Man kann diese Kurve gewissermaßen als Eichkurve benutzen, da sie uns für jede Anzahl von Trommelteilen die dazu gehörige Peptonkonzentration, mithin also auch bei Einwirkung von Serum von Schwangeren auf Placenta die durch die Tätigkeit der Abwehrfermente gebildete Menge von Peptonen angibt.

Man kann die Genauigkeit der Methode auch noch in anderer Weise darstellen.

Es lassen sich bei Benutzung der 20 mm-Kammer Konzentrationsänderungen von 0,001 % bei Benutzung der 5 mm-Kammer von 0,005 % feststellen. Der Inhalt der 20 mm-Kammer beträgt 2 ccm, es lassen sich also  $0,00002 \text{ g} = 0,02 \text{ mg}$  Pepton feststellen. Da der Inhalt der 5 mm-Kammer 0,5 ccm beträgt, lassen sich also bei ihrer Benutzung  $0,0001 \text{ g} = 0,1 \text{ mg}$  Pepton feststellen.

### Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur quantitativen Verfolgung der Abwehrfermente beschrieben, die darauf beruht, daß mit Hilfe des Löwe-Zeisschen Interferometers die Konzentrationsänderungen bestimmt werden, die durch die Auflösung der durch Einwirkung der Abwehrfermente auf die Organsubstrate gebildeten Peptone in dem zu untersuchenden Serum bedingt sind. Die «interferometrische Methode» ist besonders dadurch

gekennzeichnet, daß sie durch das Messen mit einem Kompensator eine Nullmethode darstellt, die sich durch die leichte Ablesbarkeit und das dadurch bedingte Ausschalten des subjektiven Beobachtungsfehlers auszeichnet.

### Erklärung der Tafeln.

Tafel 2. Abb. 1. Gesamtansicht des Interferometers in Gebrauchslage. Vorn eine Wasser- resp. Flüssigkeitskammer, zu beiden Seiten die Schutzkappe, der Akkumulator zur Beleuchtung des als Lichtquelle dienenden Osramlämpchens, sowie ein Aufbewahrungskasten für die Wasserkammern.

Abb. 2. Schematische Zeichnung des Flüssigkeitsinterferometers im Auf- und Grundriß. B Beleuchtungsapparat enthaltend ein Osramlämpchen und ein Linsensystem. Das auf den Spiegel S nahezu senkrecht auffallende Licht wird zurückgeworfen und durch das Objektiv des Fernrohres zu einem Interferenzbild vereinigt. Das Bild liegt dicht neben dem sehr fein einstellbaren Spalt am Okular Ok und wird durch die Cylinderlinse desselben betrachtet. Die Lichtstrahlen der parallelen Strahlenbüschel müssen auf ihrem Wege von und zu dem Spiegel S durch die Platten  $P_1$  und  $P_2$  des Kompensators K, ferner durch die planparallelen Platten des Temperierbades Tr, die Temperierflüssigkeit und durch die planparallelen Glasplatten der auswechselbaren Flüssigkeitskammer W und durch die darin enthaltenen Flüssigkeiten. Die untere Hälfte des Strahlenbüschels erzeugt das Vergleichsinterferenzfigurensystem. In der Nullage der Streifensysteme nimmt die Trommel M des Kompensators mit dem Umdrehungszähler Z ebenfalls die Nullage ein. Th Tubus für ein Thermometer.

Tafel 3. Abb. 3. Ansicht einer Wasser- resp. Flüssigkeitskammer. Gegen Verdunstung ist die Flüssigkeit durch einen Glasdeckel D geschützt.

Abb. 4. Photographische Aufnahmen von Interferenzbildchen. Sie zeigt außer der Nullage die Verschiebung der Interferenzerscheinungen, die durch die auf S. 447 angegebenen Placentapeptonkonzentrationen bei Benutzung einer 5- resp. 20 mm-Kammer bedingt sind.

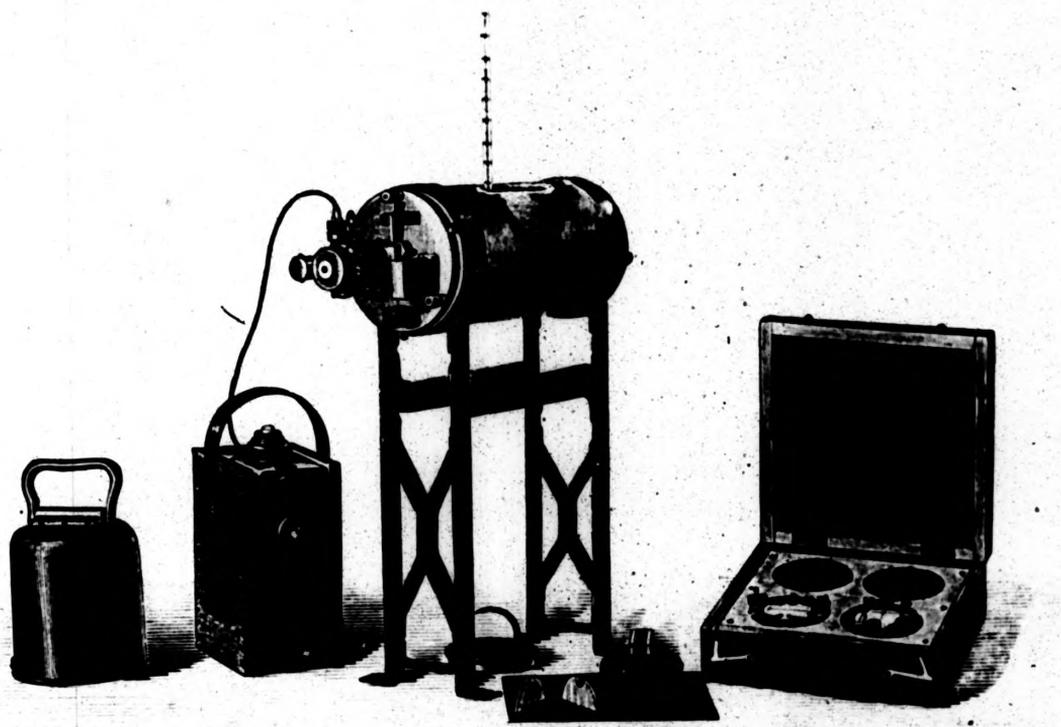


Abb. 1

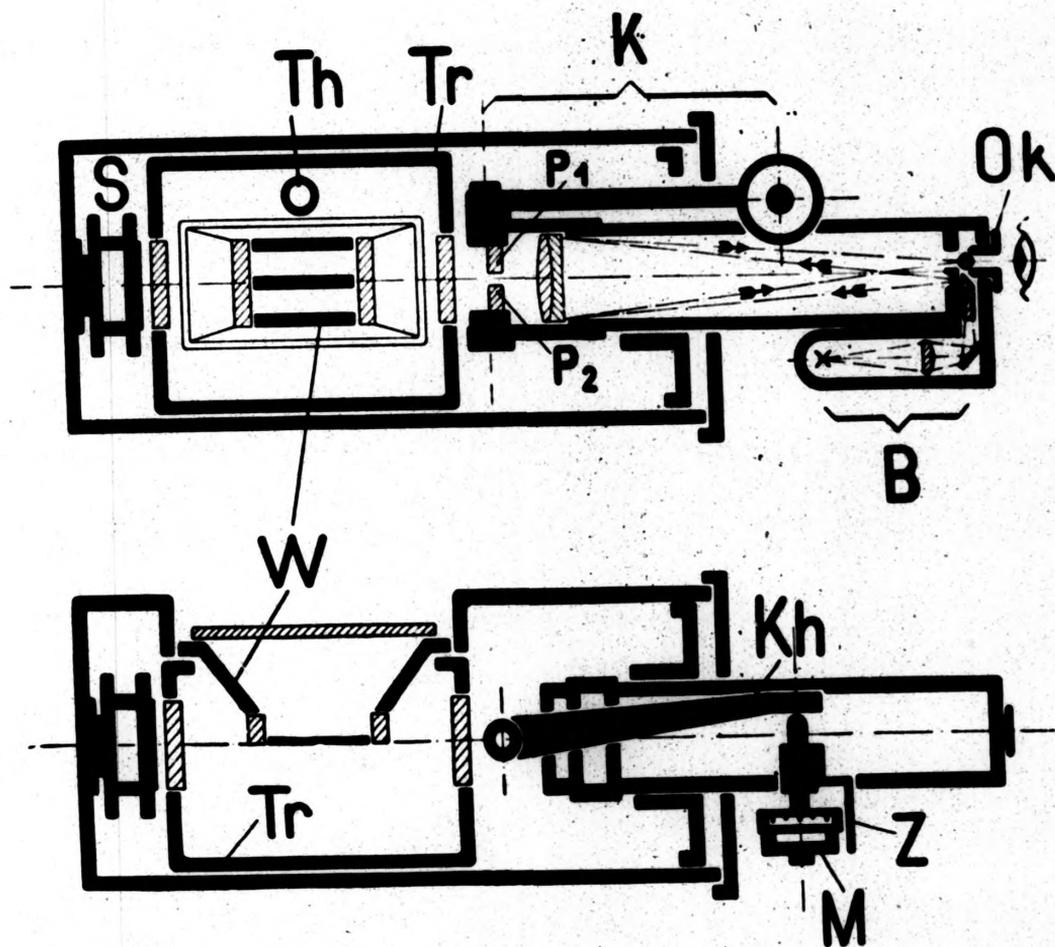


Abb. 2



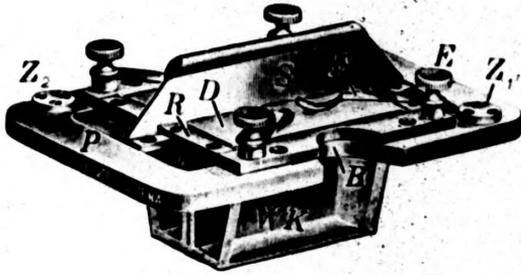
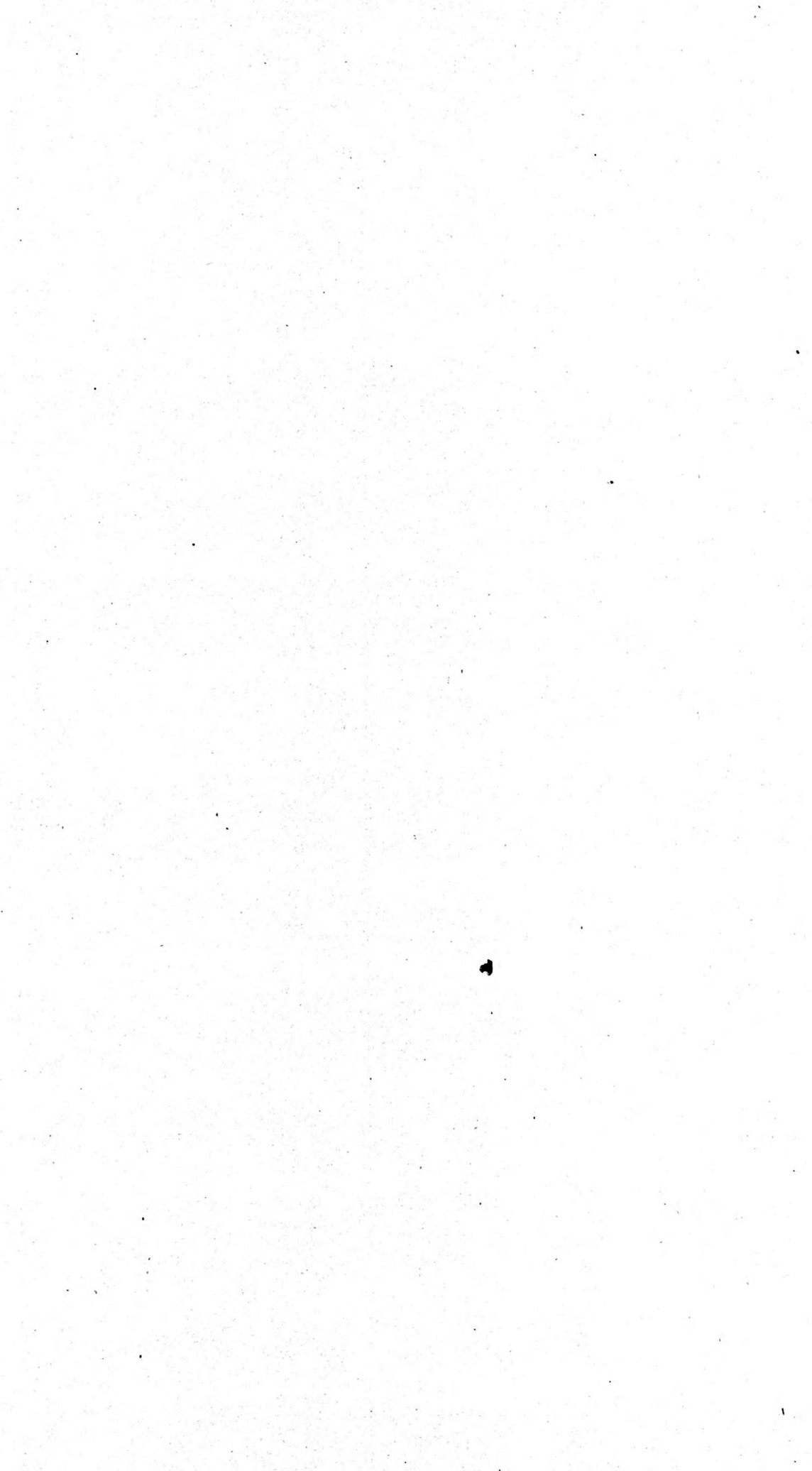


Abb. 3.

Unterschiede in Trommel- teilen			Placentapepton- Konzentration
1.	0		0 ‰
2.	3	5 mm Kammer	0,005 ‰
3.	12	20 mm Kammer	
4.	32	5 mm Kammer	0,05 ‰
5.	122	20 mm Kammer	
6.	326	5 mm Kammer	0,5 ‰
7.	1303	20 mm Kammer	
8.	0		0 ‰

Abb. 4.



1. Nullage. Die schwarzen Streifen im oberen und unteren Bild verlängern sich.

2. Das obere Bild ist um ein sehr geringes verschoben. Die schwarzen Streifen liegen nicht mehr in ihrer Verlängerung.

3. Das obere Bild ist um ein halbes Streifensystem, d. h. den Streifenabstand zweier benachbarter Streifen, verschoben.

4. Die Verschiebung ist noch stärker geworden.

5. Das obere System ist in den rechten schwach beleuchteten Teil des Gesichtsfeldes gewandert. Im weißen Mittelfeld sind nur noch schwache Streifen zu erkennen, die im Okular bunt erscheinen.

6. Das obere Streifensystem ist vollständig verschwunden.

7. Wie bei 6.

8. Nullage.