

**Mechanismus der  
Giftwirkung aromatischer Nitroverbindungen,  
zugleich ein Beitrag zum  
Atmungsproblem tierischer und pflanzlicher Zellen.**

Von

Dr. phil. et med. **Werner Lipschitz.**

Mit 3 Figuren im Text.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.)  
(Der Redaktion zugegangen am 11. Februar 1920.)

Von dem Wirkungsmechanismus der Körperklasse, deren Prototyp das Nitrobenzol darstellt, ist trotz zahlreicher Untersuchungen bisher noch keine einheitliche Vorstellung möglich. Weder der Chemismus, der aus der in den Tierkörper eingeführten  $\text{RNO}_2$ -

Gruppe (R = Phenyl) schließlich eine R  $\begin{matrix} \text{OH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$  -Gruppe<sup>1)</sup> macht,

ist in seinen Zwischenstufen experimentell geklärt, noch die physiko-chemischen Erscheinungen des Blutes, die sich spektroskopisch in den sog. Nitrobenzol- oder Dinitrobenzolphämo- globin-Absorptionsstreifen (Filehne, Huber)<sup>2)</sup> ausdrücken. Welcher Art der Zusammenhang dieser Blutderivate mit dem in Methämoglobin, Hämatin<sup>3)</sup> oder gar eine uncharakteristische braune Fällung<sup>4)</sup> umgewandelten Blutfarbstoff ist, ließ sich

<sup>1)</sup> Schmiedeberg, Arch. exp. Path. u. Pharm. Bd. 8, S. 12 (1877); Zeitschr. phys. Chem. Bd. 1, S. 266.

<sup>2)</sup> Filehne, Arch. exp. Path. u. Pharm. Bd. 9, S. 329 (1879); Huber, Virch.-Arch. Bd. 126, S. 240 (1891).

<sup>3)</sup> F. Rabe, Arch. exp. Path. u. Pharm. Bd. 85, S. 91 (1919).

<sup>4)</sup> Haldane, Makgill und Mavrogordato, Journ. of physiol. Bd. 21, S. 160 (1897).

auf Grund experimenteller Tatsachen nicht einmal diskutieren. Kommt dazu die weitgehende Unkenntnis der Konstitution des Hämoglobins<sup>1) 2)</sup>, die Unsicherheit der Beziehung: Hämoglobin, Oxyhämoglobin, Methämoglobin<sup>3)</sup>, so ist bei dem Fehlen aller exakten Grundlagen eine nur hypothetische Vorstellung von dem Wesen der Giftwirkung der organischen Nitroverbindungen die notwendige Folge.

Das drückt sich auch klar in Koberts Lehrbuch der Intoxikationen<sup>4)</sup> aus, wenn er schreibt: „Diese Blutveränderungen (Braunfärbung, Nitrobenzol-Absorptionsstreifen) kann man extra corpus durch Mischen mit arteriellem Blut nicht hervorrufen; daher vermutet Kunkel, daß der Angriff auf den Blutfarbstoff im Stadium der größten Sauerstoffarmut erfolgt . . . Nitrobenzol wirkt als solches — nicht nach Reduktion zu Anilin . . . Intravenös injiziert, bewirkt es momentane Vergiftung.“ — Bezüglich des m-Dinitrobenzol referiert Kobert: „Bei der Vergiftung des Menschen ist das Blut braun, die Blutkörperchen sind verändert, im Harn tritt Porphyrin auf. Bisweilen erscheint im Blut ein dem Methämoglobin ähnlicher Spektralstreifen (Dinitrohämoglobin?). Eine einheitliche Vorstellung über die Einwirkung von Dinitrobenzol auf Blut kann man sich noch nicht bilden.“

Immerhin haben neuere Arbeiten mehr und mehr die Richtung gewiesen, in der man den wirksamen Faktor dieser Körperklasse zu suchen hatte, seit man sich klar darüber

<sup>1)</sup> Nagel, Handb. d. Phys. 1909, 1, Ergänzungsbd. S. 1 ff. Bohrs Theorie: Nicht einmal Hämoglobin ein und derselben Tierart ist in sich einheitlich, sondern besteht aus mehreren Komponenten. Dagegen Hütners Theorie: Jedes Hämoglobin von allen Tieren ist identisch.

<sup>2)</sup> A. Gilbert et M. Weinberg, *Traité du Sang*, Paris 1913, 1, S. 102 ff. On admet que chaque espèce animale possède une oxyhémoglobine spéciale dans laquelle l'élément spécifique serait la globine, alors que la même hématine se retrouverait dans toutes les hémoglobines.

<sup>3)</sup> Ebendas. S. 113, Anm. 1. La question de la valeur du fer dans l'hémoglobine n'est toutefois pas résolue; on admettait jusqu'ici que le fer s'y trouvait au minimum, mais Manchot déduit de ses expériences de fixation de NO que Fe est au maximum malgré Küster.

<sup>4)</sup> Stuttgart 1906, 2. Aufl.

wurde, daß die typische Giftwirkung eine Umwandlung des Blutfarbstoffs in Methämoglobin sei, und daß andererseits die aromatische Nitrogruppe selbst keinen primären Methämoglobinbildner darstelle<sup>1)</sup>.

Ganz Entsprechendes gilt ja auch von der Toxikologie des Nitroglyzerins<sup>2)</sup> und der anorganischen Nitrate, bei denen schon viel früher eine vorangehende Reduktion (zu Nitrit) vermutet und zu beweisen versucht wurde<sup>3)</sup>.

Bei der Nitrobenzolvergiftung hat E. Meyer<sup>4)</sup> gefunden, daß der eingeführte Körper vor seiner Ausscheidung als Aminophenol vorzugsweise durch die Gewebe, nicht durch den Darm reduziert und damit wirksam werde; er betrachtete als Zwischenprodukt p-Nitrophenol, das er neben Aminophenol im Harn gefunden zu haben meinte, und mußte die nach (biologischer) Wirkung und Ausscheidungsform theoretisch als möglich erkannte partielle Reduktion des Nitrobenzols zu Phenylhydroxylamin als nicht beweisbar fallen lassen. Bei Prüfung seiner Angaben erkennt man allerdings, daß einmal der Nachweis des Nitrophenols nicht mit der erforderlichen Schärfe gelungen ist, worauf Heubner<sup>5)</sup> schon mit der Vermutung hinweist, daß der Harnkörper vorzugsweise nicht Nitrophenol, sondern vielleicht Nitrosophenol gewesen sei. Vor allem aber ist mit der selbst zugestandenen Tatsache einer partiellen Nitrophenolbildung im Organismus durchaus nichts darüber ausgesagt, ob der als Aminophenol ausgeschiedene Teil des Nitrobenzols gleichfalls den Weg über das Nitrophenol genommen hat, indem er zum Methämoglobinbildner wurde.

Heubner<sup>6)</sup> 7) ließ seine umfangreichen Studien über Met-

<sup>1)</sup> W. Heubner, Centr.-Bl. f. Gewerbehygiene Bd. 2. (Dez. 1914).

<sup>2)</sup> Kobert, Lehrb. d. Intox. S. 808.

<sup>3)</sup> Barth, Binz u. Gerlinger, Wind, cf. Fröhner, Toxikol. f. Tierärzte, 4. Aufl. — Vgl. auch Abelous u. Aloy (Compt. rend. 138, 382, 1904). Pflanzen wie tierische Organe reduzieren Nitrat zu Nitrit unter gleichzeitiger Oxydation von Salizylaldehyd. Lit. über das Schar-dinger-Enzym!

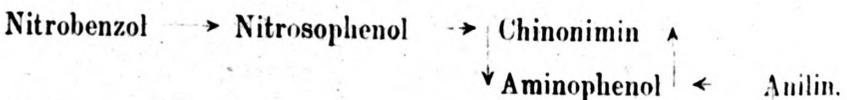
<sup>4)</sup> Zeitschr. physiol. Chem. Bd. 46, S. 497 (1905).

<sup>5)</sup> loc. cit.

<sup>6)</sup> loc. cit.

<sup>7)</sup> Arch. exp. Path. u. Pharm. Bd. 72, S. 241 (1913).

hämoglobinbildung gleichfalls an der Tatsache ansetzen, daß Körper wie Nitrobenzol, Phenacetin und Anilin als p-Aminophenol vom Tier ausgeschieden werden; von hier aus rückwärts gehend, konnte er wahrscheinlich machen, daß die Aminophenole selbst — nach Einführung ins Blut — nicht als unmittelbare Methämoglobinbildner fungieren, sondern daß sie im Blut primär erst oxydiert werden. Zur Erklärung dieses Vorganges wie der Tatsache, daß bei Sauerstoffgegenwart Aminophenol Hämoglobin zu einem hohen Prozentsatz in Methämoglobin umwandelt, trotz des ungünstigen Zahlenverhältnisses der Moleküle von z. B. 1 : 50, macht Heubner die Annahme, daß p-Aminophenol intermediär sich zu Chinonimin<sup>1)</sup> oxydiere und dieses bei der Bildung des Methämoglobins sich wieder in Aminophenol zurückverwandelt; also sei bei diesem katalytisch erscheinenden Pendelvorgang die Chinongruppierung der primäre Methämoglobinbildner. Durch solche Betrachtungen veranlaßt, deren — fehlende — experimentelle Basis der Nachweis von Aminophenol in Blut oder Lymphe nach Einverleibung von Nitrobenzol oder Anilin und weiter der Nachweis von Chinonimin als zweiten Pendelpunktes bei künstlicher Einführung von Aminophenol ins Blut wäre, stellt Heubner folgendes Schema für den Hauptmechanismus der Stoffwechselvorgänge bei der Nitrobenzol- und Anilinvergiftung auf:



Nebenbei hält er auch die intermediäre Bildung von Nitrosobenzol (mit noch unbekannter Blutwirkung) für möglich und das Auftreten von (stark methämoglobinbildendem) Phenylhydroxylamin für fraglich. Daß dieses Schema gerade in seinem wichtigsten Teile auf Spekulationen ruht, geht aus der Tatsache hervor, daß von den sieben genannten Umwandlungsstufen gerade die drei direkt methämoglobinbildenden: Nitrosophenol, Chinonimin, Phenylhydroxylamin bisher in

<sup>1)</sup> Willstätter, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 37, S. 1494 und 4605; Bd. 38, S. 2348.

keiner Weise als intermediär entstehend nachgewiesen wurden, während die Verknüpfung von Nitrobenzol und Anilin durch ihr gleiches Ausscheidungsprodukt, Aminophenol, bekannt war<sup>1)</sup>; dazu kommt die Unsicherheit, ob überhaupt diese Substanz noch als blutvergiftendes Agens in Betracht zu ziehen ist oder aber sich erst sekundär als dessen Reaktionsprodukt bildet. Demgegenüber hat der von E. Meyer und Heubner erwogene Gedanke, daß auch die Hydroxylaminstufe vielleicht eine Rolle bei der Methämoglobinbildung derartiger Körper spielen könnte, eine nicht vorauszusehende Bedeutung durch das Experiment bekommen, wie sich im Laufe dieser Arbeit zeigen wird.

Zu einem viel eindeutigeren Ergebnis als durch Tierpassage sind E. Pozzi-Escot<sup>2)</sup> und vor allem Neuberg und Welde<sup>3)</sup> bei dem biochemischen Abbau von Nitrobenzol, Nitroäthan und Nitromethan durch Zusatz zu gärender Hefe gelangt: sie haben dabei Anilin, Äthylamin und Methylamin gewonnen.

Freilich deutete auch bei dieser phytochemischen Reduktion des Nitrobenzols nichts darauf hin, daß der theoretisch zwangsmäßig durchlaufenen Zwischenstufe des Hydroxylamins eine Bedeutung als Haltepunkt der Reaktion und Höhepunkt der Giftigkeit für den Tierkörper zukomme. Übrigens beurteilte Neuberg selbst die Aussicht, Zwischenstufen bei der biologischen Nitrobenzolreduktion zu fassen, und die Gewähr, ihre Entstehung auf indirektem Wege zu beweisen, folgendermaßen: „Diese selbst zu fassen, ist bekanntlich auch in vitro nur ausnahmsweise möglich, und ein solcher Versuch ist bei biologischen Experimenten von vornherein wenig erfolgversprechend; dagegen kann man einen anderen Weg beschreiten“, nämlich die Zwischenstufen auf ihre phytochemische Reduktion zu untersuchen. So prüften dann Neuberg und Welde Azoxybenzol, Azobenzol, Nitrosobenzol und  $\beta$ -Phenylhydroxyl-

<sup>1)</sup> Schmiedeberg loc. cit.

<sup>2)</sup> Bull. de l'Association de Chim. de Sucr. et Dist. Bd. 21, S. 1073.

<sup>3)</sup> Bioch. Zeitschr. Bd. 60, S. 472; Bd. 62, S. 470; Bd. 67, S. 18 (1914).

amin und zeigten, daß sich nur aus den beiden letzten Anilin gewinnen ließ: „Die Resultate der Versuche sprechen demnach mit einiger Wahrscheinlichkeit dafür, daß die phytochemische Reduktion der Nitrogruppe über die Stufen des Nitroso- und Hydroxylaminrestes gehen kann.“

All die von früheren Autoren gefundenen Tatsachen: Umwandlung von Nitrobenzol in p-Aminophenol im Tierkörper, in Anilin durch Hefe, — Umwandlung wiederum von Anilin und seinen Derivaten in Aminophenol im Tierkörper (p-Aminophenol beim Kaninchen, o-Oxycarbanil beim Hunde<sup>1)</sup>), — Umwandlung endlich von Phenylhydroxylamin in p-Aminophenol<sup>2)</sup> und N-Nitrosophenylhydroxylamin<sup>3)</sup> in p-Aminophenol-glukuronsäurelactam im Kaninchenkörper, vertragen sich mit der Auffassung, daß die Bildung der OH-Gruppe einen sekundären Vorgang im Tierkörper darstellt, daß es sich dabei entweder um eine Umlagerung des intermediär entstehenden Phenylhydroxylamins handelt, wie sie auch leicht durch anorganische Säuren vor sich geht, oder um eine nachträgliche Oxydation des schon durch vollständige Reduktion gebildeten Anilins.

Bei der grundlegenden Bedeutung, die P. Ehrlichs farbenanalytische Studien<sup>4)</sup> für die Erkenntnis der biologischen Reduktionsvorgänge besitzen, ist es wohl mehr als ein Zufall zu nennen, daß der Schlüssel für die Erkenntnis der Biochemie und Toxikologie aromatischer Nitroverbindungen sich aus der Beobachtung des Entstehens ihrer Reduktionsprodukte durch intravitale Wirkung des Lungengewebes ergab. Es wurde nämlich einem Kaninchen eine Suspension von m-Dinitrobenzol in die Lunge mit der Wirkung raschen Todes eingegossen; dem durch Ehrlich bekannten „eminenten Reduktionsvermögen des Lungenparenchyms“ entsprach eine intensive Braunfärbung des Lungenblutes, die spektroskopisch als von maximaler Methämoglobinbildung herrührend erkannt wurde.

<sup>1)</sup> Jaffe und Hilbert, Zeitschr. phys. Chem. Bd. 12, S. 295 (1888).

<sup>2)</sup> E. Meyer loc. cit.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 18 (1914).

<sup>4)</sup> „Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus“, Hirschwald (1885).

Entsprechende Versuche nun, die Methämoglobinbildung des Dinitrobenzols durch Gewebe in vitro zu fördern, gelangen, und das weitere Studium der Erscheinung ergab, daß überlebende Gewebe in glatter Weise auch ohne Anwesenheit von Blut, das somit nur die Rolle des Indikators spielte, zugesetztes gepulvertes Dinitrobenzol in wäßriger Suspension in die niedere Reduktionsstufe verwandeln. Das entstandene m-Nitrophenylhydroxylamin, durch seine Gelbfärbung im Gegensatz zum farblosen Dinitrobenzol auffallend, entfaltet nun eine unmittelbare höchst intensive Giftwirkung auf den Blutfarbstoff<sup>1)</sup>: Sowohl hämolysiertes Blut als der Farbstoff intakter Blutkörperchen wird in Methämoglobin umgewandelt und damit zur Atmung unbrauchbar. Das entsprechende Resultat hatten toxikologische Versuche am Frosch und Kaninchen mit auf elektrochemischem Wege rein dargestelltem Nitrophenylhydroxylamin; seine Hauptwirkung bei subkutaner oder intravenöser Injektion ist eine starke Dyspnoe des Tieres, die auf Sauerstoffmangel infolge Degeneration der Erythrocyten beruht. Bei chronischer Einführung des Giftes treten bald jene eigentümlichen Veränderungen im mikroskopischen Bild des braunen Blutes auf, die als Polychromatophilie und Anisocytose der Erythrocyten, Entstehung von Heinzschen Körperchen neben Auftreten des Methämoglobinstreifens erkennbar werden, und die vom Studium anderer Blutgifte her bekannt sind<sup>2)</sup>. Über andere Giftwirkungen der Hydroxylaminverbindung wird noch zu sprechen sein.

Zur Ausscheidung kommt Nitrophenylhydroxylamin ebenso wie Dinitrobenzol aller Wahrscheinlichkeit nach als m-Nitroanilin; wenigstens beweist in beiden Fällen die starke Rotfärbung des angesäuerten Harnes nach Diazotierung und Kuppelung mit  $\alpha$ -Naphthol in sodaalkalischer Lösung das Vorhandensein einer Aminogruppe, die ausbleibende Rotfärbung des nach Ansäuern und Erhitzen wieder alkalisierten Harnes die fehlende

<sup>1)</sup> Zur Toxikologie des  $\beta$ -Phenylhydroxylamins, vgl. L. Lewin, Arch. exp. Path. u. Pharm., Bd. 35, S. 401 (1895).

<sup>2)</sup> Vgl. z. B. D. Friedstein, Fol. haemat. Bd. 12, 2, S. 239 (1911).

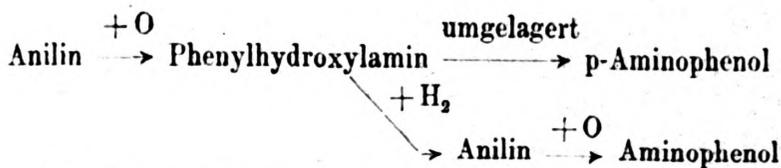
Gruppierung  $\begin{cases} \text{NO}_2 \\ \text{OH} \end{cases}$  und die negativ verlaufende Griefsche Reaktion (Bildung von Bismarckbraun durch salpetrige Säure) das Fehlen von Phenylendiamin.

Dieses Resultat steht in bester Übereinstimmung mit der Umwandlung von Nitrobenzol in Anilin im Gärversuch von Neuberg und Welde und der phytochemischen Reduktion von Dinitrobenzol, die über die Hydroxylaminverbindung zur Aminoverbindung führte, und die weiterhin beschrieben werden wird.

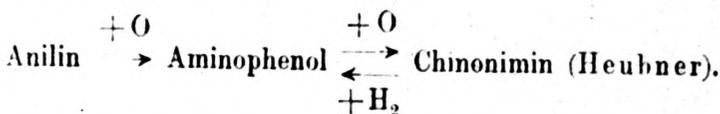
Ein besonderes Augenmerk wurde — im Hinblick auf die Entstehung und von Heubner supponierte toxikologische Bedeutung der Aminophenole im Falle des Nitrobenzols — auf die Möglichkeit einer Nitroaminophenolbildung gerichtet, allein es konnte nach den charakteristischen chemischen Reaktionen aller vier *m*-Nitroamino-isomeren eine Entstehung mit erheblicher Sicherheit ausgeschlossen werden und vor allem das Fehlen einer unmittelbaren toxischen Bedeutung durch Untersuchung der reinen kristallisierten Substanzen auf ihre Blutwirkung bewiesen werden; übrigens fehlt diese in gleicher Weise dem *m*-Nitrilanilin und kommt auch dem *m*-Nitrosnitrobenzol nur in vermindertem Maße zu.

Stellt sich somit das Auftreten des *p*-Aminophenols nach Nitrobenzolzufuhr immer deutlicher als ein nur sekundärer biochemischer Prozeß dar, so wird auch seine toxikologische Bedeutung stark erschüttert nicht nur dadurch, daß das auf das Blut wirkende Gift aller Wahrscheinlichkeit nach  $\beta$ -Phenylhydroxylamin und nicht Aminophenol ist, sondern auch dadurch, daß im Sinne Heubners die Aminophenolgruppierung gar nicht zur Methämoglobinbildung befähigt ist, sonst müßte man erwarten, daß die weitere Einführung einer  $\text{NO}_2$ -Gruppe in die *m*-Stellung zur Aminogruppe des *p*-, *o*- oder *m*-Aminophenols nicht seine toxische Wirkung auf Blut *in vitro* so weitgehend herabsetzte.

Für die Auffassung der Wirkung des Anilins gibt es folgende Möglichkeiten:



(sukzessive Umwandlung in verschiedenem Sinne in verschiedenen Gewebsabschnitten).



Die Entscheidung zwischen ihnen scheint wiederum weiterer experimenteller Erforschung zugänglich zu sein einmal durch Versuche, in durchströmten isolierten Organen eingeführtes Anilin oxydativ zu verändern, was mit Hilfe zerschnittener Organe uns nicht gelang<sup>1)</sup>, weiter indirekt durch Prüfung der Nitraniline. Daß der N-Oxydation von Anilinderivaten eine Bedeutung für ihre methämoglobinbildende Wirkung zukommen kann, geht schon aus Versuchen Heubners hervor, von denen anzuführen sind: Die Indifferenz des Dimethylanilins auf Blut in vitro im Gegensatz zu Anilin und asymm. m-Xylidin, die prompte methämoglobinbildende Wirkung des o-, o-, p-Trichloranilin im Tierversuch, bei dem eine Abspaltung von Halogen vom Ring und Bildung von Chinoderivaten ziemlich sicher auszuschließen ist.

Die große Übereinstimmung der klinischen Vergiftungssymptome bis in kleine Einzelheiten herab nach Nitrobenzol- und Anilinzufuhr weist sehr deutlich auf das gleiche Agens als Ursache hin, und nach dem Gesagten ist es nicht verwunderlich, daß auch bei Dinitrobenzol keine aus dem gleich zu umschreibenden Symptomenkomplex herausfallenden Vergiftungserscheinungen beobachtet worden sind. Da wir nunmehr an der Nitrogruppe gezeigt haben, daß die Hauptwirkung nicht von ihr selbst ausgeht, sondern von der sekundär

<sup>1)</sup> Als Ort der hauptsächlichsten biochemischen Anilinoxidation konnte ich unterdessen die Leber feststellen. Die künstlich mit einem Gemisch von defibriniertem Blut und sehr verdünntem Anilinwasser durchströmte überlebende Hundeleber verursachte in kurzer Zeit enorme Methämoglobinbildung, während ein Kontrollgemisch methämoglobinfrei blieb. Über Einzelheiten werde ich später berichten.

entstandenen Hydroxylaminverbindung, liegt der Schluß nahe, daß das gleiche vom Anilin gilt: Vom Nitrobenzol wie vom Anilin ist beobachtet worden, daß bereits die Einatmung von Dämpfen oder perkutane Aufnahme zur Vergiftung genügen kann, beide reizen zuerst das Zentralnervensystem, um es dann zu lähmen, beide wirken gefäßerweiternd und blutdrucksenkend, sie bewirken Temperaturabfall, Methämoglobinbildung, kleine subkutane oder Organhämorrhagien, sie machen Dyspnoe, schädigen die Herzaktion, rufen Kopfschmerzen, mitunter Ikterus, klonische Krämpfe, Sensibilitätsstörungen, Sehstörungen hervor, der Gang wird taumelnd, die Sprache lallend, Gesicht, Lippen, Fingernägel graublau cyanotisch<sup>1)</sup>). Vom Anilin wird ausdrücklich erwähnt<sup>2)</sup>, daß der Sektionsbefund dem nach Nitrobenzolvergiftung ähnelt, anderseits wird darauf hingewiesen, daß der Nachweis von Anilin in der Leiche keineswegs beweist, daß es als solches eingeführt worden war, da es durch Reduktion von Nitrobenzol entstanden sein könne<sup>3)</sup>; ausgeschieden werden beide Körper als gepaartes p-Aminophenol. Als alleinige Folgen dagegen der Anilinvergiftung sind Speichelfluß, Harndrang, Blasenstörungen beschrieben, — als Folgen der Nitrobenzolvergiftung Ekchymosen der Magen- und Darmschleimhaut, Muskelstarre und der „Nitrobenzolabsorptionsstreifen“ des Blutes. —

Von besonderer Bedeutung für das Verständnis der außerordentlich schwankenden Vergiftungsschwere der verschiedenen Tierarten gegenüber indirekten Blutgiften (z. B. Nitrokörpern) scheinen nun Versuche zu sein, die die große Verschiedenheit des quantitativen Ausmaßes von im Organismus gebildetem direkten Gift (Hydroxylaminen) beweisen. Es ist charakteristisch und leicht reproduzierbar, daß gleiche Mengen den lebenden Tieren (Frosch, Meerschweinchen, Katze, Kanin-

<sup>1)</sup> Starkow, Zur Toxikologie der Körper der Benzingeruppe, des Nitroglyzerins, der Salpeter- und Schwefelsäure. Virch. Arch. f. path. Anat., Bd. 52, S. 464 (1871.)

<sup>2)</sup> Kobert, Lehrb. d. Intoxikationen.

<sup>3)</sup> Filehne, Arch. exp. Path. und Pharm. Bd. 9. S. 348 (1878); vgl. auch Letheby, Ollivier, Bergeron.

chen) entnommenen Muskelgewebes unter gleichen Bedingungen ganz verschiedene Mengen Nitrophenylhydroxylamin aus gleichen Mengen Dinitrobenzol bilden, so daß *ceteris paribus* schon aus diesem Grunde eine verschiedene Giftwirkung an den einzelnen Tierarten zu erwarten ist. — Die von Ehrlich am Gesamtorganismus von Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen, Tauben gefundene Verschiedenheit der Farbstoffreduktionen ist etwas völlig Analoges, nur daß ihr die Beziehung zum Toxizitätsgrade fehlt: „Die vorliegenden Beobachtungen zeigen, daß die Reduktionskraft des Organismus überhaupt, die wir durch die Kombination der vitalen und postmortalen Leistung messen können, keine einheitliche sei, sondern daß sie, wie dies auch *a priori* zu erwarten, von der Tierspezies in hohem Grade beeinflußt werde<sup>1)</sup>).

Weitere Beobachtungen über die Variabilität von Giftung und Entgiftung entsprechend der Tierart liegen vor wie die Heubners<sup>2)</sup>, daß aus Phenacetin der wirksame Stoff in beträchtlichem Umfang nur im Stoffwechsel des Fleischfressers (wohl durch Hydrolyse) entsteht, daß Kaninchen im Gegensatz zu Fleischfressern Aminophenole (wohl durch Kupplung) rasch unwirksam machen können etc., jedoch handelt es sich bei diesen Beobachtungen fast ausschließlich um qualitativen Nachweis häufig nicht genau definierbarer Stoffwechselvorgänge am ganzen Tier, während in unserem Falle überlebendes Gewebe verschiedener Tierarten bei gleicher Reduktionsintensität (Bildung der gleichen Reduktionsstufe) eine starke Variabilität der quantitativ bestimmbar Menge des Reaktionsproduktes erkennen läßt.

Die Analyse des Wesens der Giftwirkung führte nun weiter zu der Erkenntnis eines zweiten Faktors, daß nämlich gleiche Mengen Blutes verschiedener Tierarten auf gleiche Mengen *in vitro* zugeführten Giftes in verschiedener Schnelligkeit und Stärke mit Vergiftung reagieren; und zwar ließ sich nach-

<sup>1)</sup> „Das Sauerstoffbedürfnis“ S. 39. — Ein Gegenstück dazu bildet der von H. M. Vernon gefundene wechselnde Gehalt an „Indophenoloxydase“ in den verschiedenen Geweben verschiedener Tiere. *Journ. of physiol.* Bd. 42, S. 402 (1911); Bd. 43, S. 96 (1911).

<sup>2)</sup> *loc. cit.*

weisen, daß es in der Hauptsache weder das spezifische Serum noch die spezifische Blutkörperchenhülle, noch endlich der relative Gehalt an Hämoglobin sei, der die wechselnde Stärke der Methämoglobinbildung bedinge, sondern die Art des Erythrocyteninhaltes. Man kommt sicherlich der biologischen Wahrheit am nächsten mit der Anschauung, daß dieser wichtige Giffaktor in der Empfindlichkeit der verschiedenen Hämoglobinarten, d. h. — bei Annahme der Gleichheit des Hämatins in allen — in der Konstitution der verschiedenen Globine beruhe.

Für die Nichtidentität der Eiweißkomponente der verschiedenen Hämoglobine sprechen ja die verschiedensten Gründe: „Die Blutfarbstoffkristalle sehen bei den verschiedenen Tierarten in für jede charakteristischer Weise verschieden aus und gehören zum Teil auch verschiedenen Systemen an . . . Für die verschiedene Zusammensetzung spricht die verschiedene Löslichkeit der Kristalle, zu welcher die Leichtigkeit des Kristallisierens in annähernd umgekehrtem Verhältnis steht . . . Eine Zusammenstellung der Elementaranalysen macht wahrscheinlich, daß die Unterschiede auf Artverschiedenheit der Eiweißkomponente beruhen . . . Die Annahme einer einheitlichen Substanz kann für das Hämoglobin verschiedener Tierarten nicht behauptet werden, denn sein hauptsächlichster Bestandteil ist eiweißartig, und es wäre merkwürdig, wenn dieser nicht artspezifisch sein sollte.“<sup>1)</sup>

Es lassen sich also als heute bereits erkennbare Faktoren der Wirkung von „indirekten“ Giften folgende unterscheiden:

1. Selbstgiftung des Organismus durch Umwandlung des eingeführten Körpers.
2. Entgiftung des Organismus durch Weiterverwandlung des toxischen Körpers.
3. Vergiftung des Organismus gemäß der Reaktionsstärke des giftempfindlichen Organes, — alles pro Zeiteinheit.

Dabei ist ohne weiteres klar, daß für die resultierende Gesamtgiftigkeit Faktor 1 mit steigender Stärke positiv wirksam wird, Faktor 2 negativ und Faktor 3 wieder positiv. Es

<sup>1)</sup> Zit. nach Nagel, Handb. d. Physiol., I. Ergänzungsbd. 1919, S. 1 ff.

ist vielleicht zweckmäßig, diese Trias von Funktionen durch den Begriff: „Individueller Giftfaktor“ zusammenzufassen und durch folgendes Schema auszudrücken:

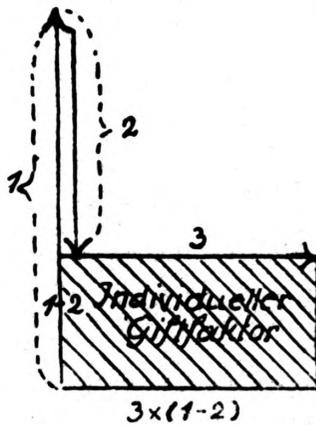


Fig. 1.

das sicherlich später noch einmal eine erhöhte Bedeutung erhalten wird, wenn die pharmakologische Analyse in dem Umfange das absolute Maßsystem als Basis gewinnen wird, wie Physik und Chemie es schon heute haben und die Physiologie auf dem Wege ist, es zu bekommen. (Vgl. A. Pütter, Studien zur Theorie der Reizvorgänge 1—4, 5, 6<sup>1</sup>).

Es ist nun bemerkenswert, daß 1. der Kaninchenmuskel aus Dinitrobenzol in geringstem Umfange die giftige Reduktionsstufe herstellt, daß 2. das Kaninchen giftige aromatische N-haltige Körper am raschesten unwirksam macht, daß 3. sein Hämoglobin am wenigsten empfindlich z. B. gegen Nitrophenylhydroxylamin ist, so daß die Gesamtwirkung ein Minimum gegenüber z. B. Frosch, Meerschweinchen, Katze, Hammel darstellt, wie es ja aus vielfachen Tierversuchen mit Giften dieser Körperklasse bekannt ist.

Es konnte hier natürlich nicht der Ort sein, die Giftwirkung nach ihren Komponenten für jede Tierart zahlenmäßig festzulegen und mit der am ganzen Tier beobachteten toxischen Dosis in Beziehung zu bringen. Dazu wäre ja eine systematische Prüfung wenigstens der wichtigsten Gewebsarten auf Reduktionskraft und -Umfang nötig mit der da-

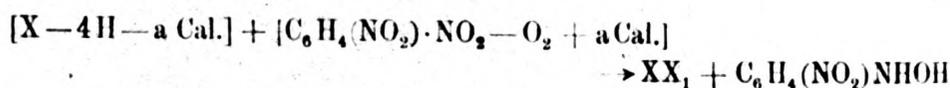
<sup>1</sup>) Pflügers Arch. Bd. 171, S. 206—261; Bd. 175, S. 371; Bd. 176, S. 39.

mit Hand in Hand gehenden getreueren Nachahmung physiologischer Verhältnisse: Durchströmung überlebender intakter Organe, Toxizitätsprüfung intakter Blutkörperchen bei Körpertemperatur, Ausarbeitung neuer Schnellmethoden zur Gewinnung einer Vorstellung von der Entgiftungsart und -Schnelligkeit<sup>1)</sup>.

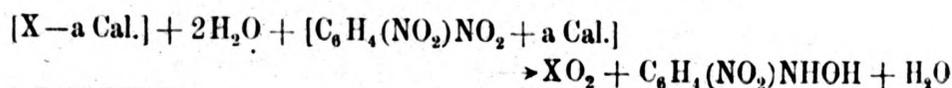
Hier jedoch kam es darauf an, die prinzipiellen Ursachen aufzudecken für die Verschiedenheit der Giftwirkung am Gesamttier — und sich als Ziel zu setzen, wiederum diese Verschiedenheiten unter größerem Gesichtswinkel zusammenfassend zu begreifen: als Funktionen der Reaktionsgeschwindigkeiten, als Funktionen der thermodynamischen Potentiale.

Damit drängte sich nun als interessanteste Aufgabe, weil von der biologisch allgemeinsten Bedeutung, die Beantwortung der Frage nach dem Mechanismus dieses Reduktionsvorganges auf, den wir wieder seinerseits als die Ursache der toxischen Wirkung der  $\text{NO}_2$ -Gruppe kennen gelernt haben.

Die Tatsache bereits, daß die durch das Gewebe vor sich gehende Umwandlung  $\text{RNO}_2 \rightarrow \text{RNHOH} + \text{O}_2$  eine stark endotherme Reaktion ist, macht das Aufsuchen jenes Energiespenders wichtig, von dem man — nach dem Prinzip der jeweils möglichst einfachen ausreichenden Vorstellung — von vornherein annehmen durfte, daß er gleichzeitig der Spender aktivierten Wasserstoffes<sup>2)</sup> ist:



oder als hydroklastische Reaktion geschrieben:



<sup>1)</sup> Untersuchungen von teilweise verwandter Art sind von Nencki und Sieber am Benzol gemacht worden: Der Umfang seiner Oxydation zu Phenol ist individuell verschieden, beim gleichen Tier aber während langer Zeiträume konstant. Die Menge des gebildeten Phenols kann also als Maß für die physiologische Oxydation benutzt werden; sie wurde unter dem Einfluß der Phosphorvergiftung und der Narkose stark erniedrigt gefunden (Pflügers Arch. Bd. 31, S. 319 [1883]).

<sup>2)</sup> H. Wieland, Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge II. III. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 3327; Bd. 47, 2085.

Darüber hinaus aber durfte man hoffen, ganz allgemein in der Erkenntnis der biologischen Reduktionsvorgänge Fortschritte zu machen. Daß es sich bei ihnen um sehr große erforderliche, also disponible Energiekonzentrationen handelt, geht in unserem Falle aus der elektrochemischen Darstellung des *m*-Nitrophenylhydroxylamin aus Dinitrobenzol hervor, für die zu glatter Umsetzung 8–10 Volt Klemmspannung verlangt werden. Um zu einem zahlenmäßigen Erfassen der bei derartigen Vorgängen auftretenden Energiemengen zu gelangen, die in dem einen chemischen System frei werden, um ein zweites gekoppeltes in Bewegung zu setzen, ist Vorbedingung, die freie Energie jeder einzelnen biochemischen Teilreaktion zu messen<sup>1)</sup>. Mit einer thermochemischen Formulierung, wie sie Meyerhof<sup>2)</sup> für die Umwandlung des Methylenblaus in die Leukobase gebracht hat und, auf ihr fußend, Thunberg<sup>3)</sup> für das System: Methylenblau + Bernsteinsäure  $\xrightarrow{\text{Muskelgewebe}}$  Leukomethylenblau + Fumarsäure — 5,6 Cal. ist wenig ausgesagt, — besonders bei Berücksichtigung des Umstandes, daß das Berthelotsche Gesetz nicht streng richtig ist, und daß der bei seiner Anwendung, d. h. Subtraktion der Bildungswärmen der chemischen Körper voneinander, gemachte Fehler einen wechselnden unbekanntem Betrag hat<sup>4)</sup>. Nun besitzt die physikalische Chemie bisher nur zwei Methoden zur Messung freier Energie, die beide im Gebiet der Biologie nur in seltenen Fällen anwendbar sind, nämlich bei wasserlöslichen thermodynamisch genügend stark wirksamen Körpern oder aber bei solchen, die reversible, ein Gleichgewicht bildende Reaktionen eingehen. Immerhin aber stellen gerade die Farb-

<sup>1)</sup> P. Ehrlich: „Wenn man bedenkt, daß aus dem Alizarinblau erst unter Zuhilfenahme höchst eingreifender Reagentien Weiß entsteht, so wird man sich eine Vorstellung von der geradezu kolossalen Reduktionsfähigkeit der Gewebe bilden können.“ Loc. cit. S. 35.

<sup>2)</sup> Pflügers Arch. Bd. 149, S. 250.

<sup>3)</sup> Skand. Arch. Bd. 35, S. 163 (1917).

<sup>4)</sup> Vgl. Höber, Physikal. Chemie der Zellen und Gewebe, 4. Aufl., S. 742 ff. E. Eichwald und A. Fodor, Die physikal.-chem. Grundlagen der Biologie S. 456 ff. (1919).

stoffe mit ihren Leukobasen derartige Systeme dar, und es sind von mir Versuche im Gange, die eine Bestimmung der freien Energie zum Ziele haben einmal durch Anwendung der Van t'Hoffschen Formel  $A = RT \ln \frac{k}{x}$ <sup>1)</sup>, das andere Mal durch Messung des Oxydations-(Reduktions-)potentials von Farbbase (Farbstoff). Darüber wird später zu berichten sein.

Die Größe der Reaktionsgeschwindigkeit des Muskelgewebes mit dem zu reduzierenden Körper läßt sich daran erkennen, daß trotz der höchst ungünstigen Reaktionsbedingungen: der unvollkommenen Durchmischung zerstückelten Muskels mit dem in Wasser praktisch unlöslichen Dinitrobenzolphpulver die Reaktion bereits im Verlaufe von 15—20 Minuten sichtbar wird, um in 2—4 Stunden ihren Endpunkt zu erreichen. Von der Schwerlöslichkeit des Dinitrobenzols in kaltem Wasser kann man sich übrigens nicht nur mit Hilfe chemisch-analytischer Methoden überzeugen, sondern auch durch stalagmometrische Messungen; aus der sehr geringen Herabsetzung der Oberflächenspannung von destilliertem Wasser wie von wäßrigem Muskelauszug durch zugesetztes Dinitrobenzol muß man schließen, daß die Reduktion nicht im homogenen Lösungsmittel vor sich geht, sondern in den Zellen, vielleicht in den Zellmembranen selbst, die ja zur Aufnahme derartiger aromatischer Körper sehr geeignet sind.

Dazu würde die äußere Erscheinung des Vorganges auch gut stimmen, daß zuerst sich nur die Muskelstückchen selbst gelb anfärben, um beim Umrühren das gefärbte Reduktionsprodukt zum erheblichen Teil an das umgebende Wasser abzugeben.

In diesem Zusammenhang ist an Ehrlichs Kriterien der für seine Reduktionsstudien verwendungsfähigen Farbstoffe zu denken, deren eines die Unlöslichkeit dieser Körper (in Wasser) ist<sup>2)</sup>: „Günstiger liegen die Verhältnisse bei den festen (unlöslichen) Pigmenten, indem diese zunächst viel leichter von den Zellen aufgenommen werden als die löslichen, deren Ein-

<sup>1)</sup> Siehe Anm. 4 S. 15.

<sup>2)</sup> loc. cit. S. 17/18.

dringen die Grenzflächen der Zelle einen erheblichen, meist absoluten Widerstand entgegenzusetzen . . . Der Unterschied, der zwischen löslichen und unlöslichen Farbstoffen besteht, begründet sich eben darin, daß unlösliche Farbstoffe mechanisch selbst in Zellen mit diffusionsunfähigen Membranen eindringen, während die löslichen Farbstoffe nur dahin gelangen, wohin die Zellmembranen für sie . . . durchlässig sind.“

Die erste Frage nach der Kinetik des Reduktionsvorganges nun betraf den Grad seiner Abhängigkeit von der Zellstruktur. Ihre Zerstörung durch Eintauchen von Froschmuskeln in flüssigen Stickstoff, rasches Pulvern und Wiederauftauen ergab trotz des bekannten Intaktbleibens der Zellfermente eine fast völlige Hemmung der Reaktion; diese wurde in gleicher Weise durch rasche Bereitung von Muskelpreßsäften hervorgerufen und erfolgte in schon sehr merklichem Umfange durch Zerreiben der Muskulatur mit Quarzsand. Dieser Befund bereits deutete in Verbindung mit den Erfahrungen anderer Autoren<sup>1)</sup>, daß durch Zerstörung der Zellstruktur Oxydationsprozesse und der Gasaustausch in überlebenden Zellen geschädigt werden, darauf hin, daß nicht die Reduktion des Nitrokörpers primär durch den Eingriff hintangehalten werde, sondern indirekt durch Verhinderung eines empfindlichen mit ihm sehr eng verkoppelten Oxydationsprozesses.

Über die Bedeutung der chemischen Organisation der Zelle und der infolge der Protoplasmastruktur bedingten räumlichen Trennung chemischer Reaktionsorte sind wir ja seit Hofmeisters Untersuchungen immer mehr ins klare gekommen.

An diese Feststellung knüpfte sich die zweite, daß der Reduktionsprozeß durch Narkotica gelähmt wird, einer Lähmung, die nach der Höberschen Auffassung einer Ausschaltung enzymatischer Prozesse durch Dispersionsverringern

<sup>1)</sup> Thunberg, Skand. Arch. Bd. 22, S. 406; Bd. 29, S. 1. Palladin, Zeitschr. phys. Chem. Bd. 47, S. 407 (1906). Warburg, Die Wirkung der Struktur auf chem. Vorgänge, Jena 1913, Ergebn. d. Physiol. Bd. 14, S. 253 (1914). Battelli u. Stern, Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 487; Bd. 34, S. 263; Bd. 67, S. 443.

an den colloiden Enzymen gleichzusetzen ist. Ob es sich also bei den „fermentativen“ Reduktionen von Abelous und Gérard<sup>1)</sup>, die mit Hilfe von Chloroformwasser tierischen Organen thermolabile Stoffe entzogen und durch sie Nitrate und Nitrobenzol in Nitrite und Anilin umgewandelt haben wollen, um gleichartige Prozesse mit dem hier beschriebenen handelt, scheint mir sehr zweifelhaft.

Die weiteren Befunde, daß 2‰ Chinin und 0,1‰ Blausäure, kurzes Erwärmen auf 60° und Wirkung hypertotonischer Salzlösung die Reduktion lähmen, daß zugefügter gepulverter Schwefel keine Minderung der Reaktion etwa durch Ablenkung der Wirkung einer Sulfhydrylgruppe auf seine eigene Reduktion bewirkt<sup>2)</sup>, ermutigten zu der Auffassung, daß es vielleicht der „vitalste“ aller Prozesse, der Atmungsprozeß selbst sei, der die energispendende Reaktion für die Dinitrobenzolreduktion darstelle. Diese Vermutung nun wurde zur Gewißheit durch die Tatsache, daß es gelang, durch mehrmaliges Auswaschen der zerschnittenen Muskeln die Reduktion völlig aufzuheben und sie andererseits durch Zufügen von Muskelkochsaft wieder in Gang zu bringen, Operationen, die völlig parallel gehen dem Entfernen des thermostabilen Coferments der Atmung (Meyerhof) und seinem Wiederezufügen im Kochsaft. Die Übertragung dieses Reduktionsprozesses auf Lungen-, Nieren-, Lebergewebe, Magenschleimhaut, auf frische Bäckerhefe, Trockenhefe, auf Trockenhefe-Macerationssaft<sup>3)</sup> und gekeimte Rübsamen bewies die Allgemeingültigkeit dieser Reduktionsfähigkeit atmender tierischer und pflanzlicher Zellen, und die Einzelheiten der Versuche zeigten, ein wie einfaches und gleichzeitig empfindliches Reagens die Nitrogruppe für den Nachweis des Atmungsprozesses ist, da ja geringste Mengen des entstehenden Hydroxylamins sich durch seine Gelbfärbung und intensive Blutwirkung verraten.

<sup>1)</sup> Compt. rend. 129, 164; 129, 1023; 130, 430.

<sup>2)</sup> Etwas Derartiges hätte sich vielleicht erwarten lassen, nachdem Thunberg (Skand. Arch. Bd. 35, S. 181 [1918]) gezeigt hatte, daß sogar ausgewaschene Pferdemusculatur Schwefel hydriert.

<sup>3)</sup> Lebedew, Zeitschr. phys. Chem. Bd. 73, S. 447 (1911).

Im Falle des Muskelgewebes wurde es nicht für überflüssig gehalten, durch Prüfung des überlebenden ausgeschnittenen Muskels nachzuweisen, daß der Reduktionsprozeß nicht an die Phase der Muskelkontraktion, sondern an die Phase der Erholung gebunden sei; es wurde dabei — wieder in bester Übereinstimmung mit den experimentellen Untersuchungen Thunbergs<sup>1)</sup> über die Beeinflussung des Gewebsgasaustausches durch Wasserstoffionen — gefunden, daß der maximal ermüdete und dann zerschnittene Muskel zwar in Wasser keine Wirkung auf Dinitrobenzol ausübe, wohl aber es, in 1%iger Kaliumbicarbonatlösung suspendiert, sehr kräftig reduziere, eine Feststellung, die durchaus für die Verschiebung der Gewebsreaktion nach der stark sauren Seite durch angehäuften Milchsäure als ursächliches Hemmungsmoment spricht.

Für all diese den biochemischen Prozeß beeinflussenden Operationen wird ein genaueres vergleichendes Eingehen im Hinblick auf die für den Muskel schon vorliegenden Gaswechselstudien bei Anführung der einzelnen Versuche erfolgen. Es kann hier schon vorausgeschickt werden, daß in keinem Fall sich eine Unstimmigkeit zu den Ergebnissen der Gaswechseluntersuchungen zeigte. Wir glauben im Gegenteil für die von Meyerhof behauptete Identität von Atmungs- und Gärungscoferment eine neue Stütze in der Tatsache gefunden zu haben, daß der durch Auswaschen unwirksam gemachte Muskel durch zugefügten Hefekochsaft zu starker Reduktionswirkung befähigt wird.

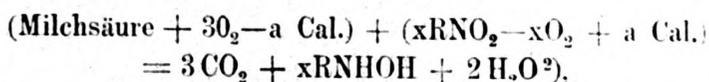
Endlich ist durch Versuche gezeigt worden, daß die Muskulatur unter anaeroben Verhältnissen eine um so promptere Reduktionswirkung auf die Nitroverbindung ausübt, daß also die Nitrogruppe als Wasserstoffakzeptor<sup>2)</sup> dient, und daß wirklich sich die im Beginn erwähnte einfachste Vorstellung von der unmittelbaren Verknüpfung eines Dehydrierungsvorganges (Atmung) und des in Frage stehenden Reduktionsvorganges als die richtige erwiesen hat. Es scheint kaum zweifelhaft, daß ein entsprechender Versuch mit Bestimmung

<sup>1)</sup> Skand. Arch. Bd. 23, S. 154 (1910).

<sup>2)</sup> H. Wieland loc. cit.

der dabei produzierten Kohlensäure seinerseits wieder unsere Versuche stützen würde, und daß eine weitgehende Proportionalität der reagierenden Stoff- ( $O_2$ ) und Energiemenge besteht. Besonders reizvoll erscheint — im Hinblick auf die zuerst von Ehrlich betonte biologische Gleichwertigkeit von „Nahrungsstoffen“ und „Giften“ — die Gegenüberstellung der Beobachtungen von Harden und Maclean<sup>1)</sup> zu der hier angeführten; sie fanden, daß zerschnittene tierische Gewebe kein geringeres  $CO_2$ -Bildungsvermögen aus Glukose haben, wenn sie in einer Sauerstoffatmosphäre bei 38° stehen, als sie in einer Stickstoff- oder Wasserstoffatmosphäre besitzen.

Man könnte also in unserem Falle unter der noch unerwiesenen Annahme, daß Milchsäure die von der Oxydation betroffene Substanz ist, die gekuppelte chemische Doppelreaktion, die der Giftwirkung der aromatischen Nitrogruppe zugrunde liegt, formulieren — unbeschadet der Wielandschen Dehydrierungstheorie:



wobei die stöchiometrischen Verhältnisse ungeklärt bleiben. Für die Bedeutung der Milchsäureoxydation als eines bei der Atmung besonders beteiligten Körpers spricht die — im Gegensatz zu andern organischen Säuren — gleich große Steigerung der Sauerstoffaufnahme wie der Kohlensäureabgabe nach Zufügen zu extrahierter Muskulatur, wie Thunberg gefunden und nur vielleicht nicht genügend hervorgehoben hat<sup>3)</sup>.

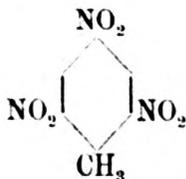
Es schien von Interesse zu sein, die Allgemeingültigkeit der Hydroxylaminbildung als Grundlage der Toxizität auch für andere aromatische Nitrokörper zu prüfen, von denen als

<sup>1)</sup> Journ. of physiol. 43, 34 (1911).

<sup>2)</sup> Vgl. F. Verzár: „Wir haben bisher keinen zwingenden Anhaltspunkt dafür, daß die  $CO_2$ -Bildung und der  $O_2$ -Verbrauch zwei voneinander unabhängigen Prozessen entsprechen.“ *Ergebn. der Physiol.* Bd. 15, S. 72. „Es ist ohne weiteres sicher, daß der Gaswechsel des Muskels mit der Wärmebildung und beide mit dem die freie Energie liefernden Vorgänge, also mit der Umwandlung der chemischen Energie verbunden sind.“ *Eben-* daselbst S. 92.

<sup>3)</sup> *Skand. Arch.* Bd. 25, S. 52 (1911).

praktisch wichtig das einfachste Glied der Körperklasse, Nitrobenzol, und das als Sprengstoff viel gebrauchte Trinitrotoluol



hervorragend. Es zeigte sich, daß es bei beiden im Gegensatz zu m- und o-Dinitrobenzol nicht möglich ist, sie durch zerschnittene Muskulatur zu reduzieren, aber aus ganz verschiedenen Ursachen; denn Nitrobenzol wird offenbar deshalb nicht verändert, weil es auf Grund seiner aromatischen Natur und hinreichenden Flüchtigkeit und Löslichkeit die Zellatmung lähmt, wie es Thunberg<sup>1)</sup> ganz allgemein für die löslichen aromatischen Verbindungen nachgewiesen hat, die er als „direkte Oxydationsgifte“ gegenüber den „indirekten“, nämlich „Strukturgiften“, bezeichnet.

Ganz anders aber ist die mit Trinitrotoluol ausbleibende Reduktion zu beurteilen; hier handelt es sich wie beim Dinitrobenzol um einen kristallisierten, in Wasser äußerst schwer löslichen, schwer verdampfbaren, nicht riechenden Körper, der gegenüber dem Dinitrobenzol sich auch im Tierkörper durch relative Ungiftigkeit auszeichnet<sup>2)</sup>. Da es von vornherein wahrscheinlich war, daß die Größe oder Anordnung des Moleküles die Reaktionshinderung verursache, haben wir an zwei Beispielen den Einfluß einer dem Dinitrobenzol angefügten CH<sub>3</sub>- und NO<sub>2</sub>-Gruppe geprüft und gefunden, daß das m-Dinitrotoluol-4<sup>3)</sup>, warzenförmige, wenig gefärbte, geruchlose, schwerlösliche Kristalle, in ziemlich glatter Weise in eine intensiv gelbe wasserlösliche, mit Alkali rotviolette, methämoglobinbildende Substanz übergehe (aller Wahrscheinlichkeit nach Nitrotoluenhydroxylamin), während bei dem gelben kri-

<sup>1)</sup> Skand. Arch. Bd. 29, S. 1 (1913).

<sup>2)</sup> White and Hay, Lancet 1901 II, 582.

<sup>3)</sup> White, Hay and Orsman, Lancet 1902 I, 1393. Röhl, Über akute und chronische Intoxicationen durch Nitrokörper der Benzolreihe, Dissertat. Rostock 1890.

stallisierten schwerlöslichen symm. Trinitrobenzol<sup>1)</sup> nur noch eine sehr geringe, wenn auch sicher nachweisbare Reduktion zu einer blutwirksamen Substanz von entsprechenden Eigenschaften zu beobachten war.

Es bedeutet somit keinen unzulässigen Gedankensprung, wenn die bei Trinitrotoluol völlig ausbleibende Reaktion mit Froschmuskulatur und die geringe Toxizität auf ganze Tiere auf eine weitere Molekülbeschwerung des schon infolge der Anhäufung von Nitrogruppen wenig reagierenden Trinitrobenzol bezogen wird.

In einem gewissen Gegensatz dazu scheint der Befund von Moore und Mitarbeitern<sup>2)</sup> zu stehen, die nach Trinitrotoluolfütterung aus dem Harn von Menschen, Affen und Kaninchen — nicht aber dem der Katzen — 2,6 Dinitroazoxytoluol gewonnen haben und der Meinung sind, daß dieser Verbindung als Stoffwechselprodukt der genannten Tiere die 2,6 Dinitro-4-hydroxylaminotoluenglukuronsäure zugrunde liege. Allein es ist aus der Veröffentlichung bisher nicht zu erkennen, ob der Nachweis der Hydroxylaminoverbindung strikter gelungen ist, als es bloß durch die Webstersche Reaktion und durch Isolierung der sekundär durch Säurewirkung entstandenen Azoxygruppe der Fall wäre. Sollte der Befund gesichert werden, so ist es trotz der in den eigenen Versuchen nicht nachweisbaren reduktiven Veränderung durch isolierte Muskulatur an sich wohl denkbar, daß gewisse Zellgruppen des Tierkörpers unter physiologischen Verhältnissen in geringem Umfang eine Reduktionswirkung auch auf Trinitrotoluol ausüben. Dafür spricht ja die Tatsache, daß Trinitrotoluol überhaupt für das lebende Tier ein Blutgift ist. Dafür spricht weiter auch das von Prof. Ellinger beobachtete Auftreten einer Aminoverbindung im Harn, die durch starke Azofarbstoffbildung nach Kuppelung mit Naphtholen kenntlich gemacht wurde.

Die Auffindung des ursächlichen Zusammenhangs, der

<sup>1)</sup> White, Lancet 1902 I, 89. White and Hay loc. cit.

<sup>2)</sup> "The causation and prevention of trinitrotoluene poisoning." Med. Research Committee, 1917, Special report series No. 11.

nach oben Gesagtem zwischen dem Giftigwerden der Nitrokörper im Organismus und der Zellatmung besteht, bringt nun Licht in bisher unerklärliche und doch gesicherte klinische Beobachtungen an Fabrikarbeitern. Es war bekannt<sup>1)</sup>, daß regelmäßige Zufuhr kleiner Alkoholmengen, die an sich völlig unschädlich sind, die Arbeiter ganz außerordentlich zu „Nitro“vergiftungen disponiere; bereits Kunkel schreibt in seinem Handbuch der Toxikologie<sup>1)</sup>: „Die Arbeiter im Reduktionsraum sollen keine geistigen Getränke trinken.“ Erinnert man sich nun, daß kleine Mengen Narkotika Erregungserscheinungen und Steigerung fast aller physiologischen Funktionen auslösen, wie Protoplasmaströmung, Keimung, Wachstum, Bewegung, Reflexerregbarkeit, Erregbarkeit peripherer Nerven, Muskelaktion, Atmungstätigkeit, — und daß mit all diesen Lebensäußerungen die Steigerung der Stoffwechselfvorgänge einhergeht: Steigerung der Atmung, Erhöhung der Oxydationen in der Leber und anderen überlebenden Organen<sup>2)</sup>, so folgt unmittelbar daraus, daß auch die mit der Gewebsatmung eng verknüpfte NO<sub>2</sub>-Reduktion eine verstärkte ist und deshalb die deletären Folgen merklicher werden. Die Annahme, daß die Erhöhung der Löslichkeit der Nitroverbindungen durch Alkoholzusatz die verstärkte Giftigkeit verursache, scheint mir demgegenüber keine ausreichende Erklärung zu sein<sup>3)</sup>.

Über diese Anwendung hinaus darf man dem biologischen Studium der Hydroxylamingruppe eine Bedeutung für Klärung mehrerer allgemein pathologischer Fragen zuerkennen: einmal für die Pathologie konstitutioneller Blutkrankheiten. Diese wurde von dem ausgezeichneten Blutmorphologen A. Pappenheim bereits ins Auge gefaßt, als er die morphologisch und tinktoriell so weitgehend übereinstimmenden Befunde bei per-

<sup>1)</sup> Jena 1901, S. 610. Vgl. A. H. Hübner, Dtsch. med. W. 45, 1272 (1919).

<sup>2)</sup> Lit. bei H. Winterstein, Die Narkose. Springer 1919.

<sup>3)</sup> Chilian, Über die Beeinflussung der Vergiftungen mit Nitrobenzol, Dinitrobenzol . . . durch Alkohol. Dissert. Würzburg 1902. E. Rost, Enzykl. Jahrbücher d. ges. Heilkunde, N. F. 2. Bd. „Nitrokörper“.

niziöser Anämie, Pyrodin- und Hydroxylaminvergiftung miteinander verglich: Aus einer Arbeit seiner Schülerin D. Friedstein<sup>1)</sup> sei zitiert, daß Ehlich und Lindenthal<sup>2)</sup> in einem Falle von Nitrobenzolvergiftung beim Menschen direkt das Auftreten des perniziös anämischen Blutbildes beschrieben, daß auch v. Domarus<sup>3)</sup> betont, nicht nur hämatologisch, sondern auch histopathologisch würden durch die methämoglobinbildenden Gifte die gleichen Organveränderungen herbeigeführt, wie sie bei der natürlichen perniziösen Anämie beobachtet werden, ebenso am Rückenmark<sup>4)</sup>. Friedstein selbst fand u. a., daß das Auftreten der Heinz-Körperchen, wie die Vergiftung mit zu starken Dosen und die Vergiftung des Blutes *in vitro* zeigt, unabhängig ist von der Methämoglobinbildung; die Heinz-Körperchen bedürfen also zu ihrer Entstehung wohl längerer Zeit oder der Vergiftung durch Abbauprodukte des Hydroxylamins, oder endlich sie beständen nicht aus fertigem Methämoglobin, sondern aus einer Übergangsform des Hämoglobins zu Methämoglobin. In einer Nachlaßarbeit<sup>5)</sup> äußert sich Pappenheim folgendermaßen: „Beim Pyrodin sehen wir, daß nicht das exogen eingeführte native Gift die direkte Ursache der hyperchromen anämischen Blutveränderung ist, sondern erst ein aus ihm durch Abbau oder Reduktion im Körper gebildetes sekundäres Gift. Wo und durch Einwirkung von welchen lebenden Organgeweben das wirksam aktivierte Abbauprodukt des eingeführten Pyrodins gebildet wird, ist nicht bekannt, wahrscheinlich nicht durch Blut und Knochenmark und nicht durch die Milz. — Die progressive perniziöse essentielle kryptogenetische Anämie ist eine direkt sekundäre hyperchrome Toxanämie, — Wirkung eigenartiger Gifte, die wohl die Konstruktion von Amidophenolen oder Hydroxylaminen haben, — endogen gebildete Gifte sind.“

<sup>1)</sup> Fol. Hämatol. Bd. XII, H. 2, S. 239 (1911).

<sup>2)</sup> Zeitschr. Klin. Med. Bd. XXX (1896).

<sup>3)</sup> Arch. exp. Path. u. Pharm. Bd. LVIII (1908).

<sup>4)</sup> Mosse und Rothmann, Deutsche med. Wochenschr. (1906).

<sup>5)</sup> Fol. Hämatol. Bd. XXIII, H. 4, S. 149 (Mai 1919).

Man erkennt, wie genau sich diesmal der Kurs morphologischer und biochemischer Forschung in einem Punkte vereinigt.

Wir glauben weiter, daß vom Studium der Hydroxylamin-Gruppe aus die Frage der Umwandlung von Hämoglobin in Methämoglobin sich noch einmal aufrollen und in vielleicht anderem als dem bisher geäußerten Sinn beantworten lassen wird. Wenn wirklich Hydroxylamin auf reduziertes Hämoglobin oxydierend wirkte, indem es den Farbstoff in Methämoglobin umwandelt, wie Heubner<sup>1)</sup> mit so großer Sicherheit annimmt, so müßte nicht Stickstoff entstehen, wie Letsche<sup>2)</sup> beobachtete, und erst recht nicht salpetrige Säure<sup>3)</sup>, sondern Ammoniak — ebenso aus Phenylhydroxylamin Anilin, das L. Lewin<sup>4)</sup> als Reaktionsprodukt im Tierversuch (ebenso wie Aminophenol) vermißte und statt dessen nur Azoxybenzol nachweisen konnte. Ich bin mit derartigen Methämoglobinstudien auf breiter Basis beschäftigt, die bereits das Resultat ergeben haben, daß auch ein zweiter Prototyp der oxydierenden Methämoglobinbildner, Kaliumchlorat, nicht unmittelbar auf hämolysiertes Blut wirkt, daß aber die Methämoglobinbildung durch Berührung mit Gewebe beschleunigt wird; somit könnte sich ein der nur indirekten Nitratwirkung paralleler Toxizitätsmechanismus auch der Chlorate ergeben.

Daß Blut allein — wenn auch erst in vielen Stunden — überhaupt mit derartigen indirekten Methämoglobinbildnern reagiert, beruht wahrscheinlich ebenfalls auf seiner Gewebeeigenschaft der Sauerstoffzehrung<sup>5)</sup>.

Endlich erwähne ich noch im Juni 1919 begonnene Versuche, die eine experimentelle Prüfung der Frage zum Ziele haben, ob es nicht vielleicht das intermediäre Stoffwechsel-

<sup>1)</sup> Z. B. Arch. exp. Path. u. Pharm. Bd. 72, S. 249 (1913).

<sup>2)</sup> Zeitschr. physiol. Chem. Bd. 76, S. 412 (1912).

<sup>3)</sup> Raimondi und Bertoni 1882, cit. n. Schmiedeberg, Grundriß der Pharm., Leipzig 1909, S. 74.

<sup>4)</sup> Arch. exp. Path. u. Pharm. Bd. 35, S. 411 (1895).

<sup>5)</sup> Vgl. Franz Müller, Fol. Hämatol. Bd. XIV, H. 3, S. 254 (1913).

produkt von Nitrobenzol und Anilin, das Phenylhydroxylamin oder seine Homologen sind, auf die jene mehrfach beobachteten Fälle von Blasentumoren der Anilinarbeiter zu beziehen sind. Im Gegensatz zu den nach den bisherigen Beobachtungen völlig fehlenden Lokalwirkungen des Anilins hat sich nämlich gezeigt, daß noch eine Lösung 1 : 15 000 von Nitrophenylhydroxylamin, in die Blase von Kaninchen und Meerschweinchen eingebracht, für ihre Schleimhaut nicht indifferent ist. Hält man also die Prüfung der Lösbarkeit des Carcinomproblems mit Hilfe biochemischer Methoden für berechtigt und den Zusammenhang von Blasentumor und Produkten der Anilinfarbenindustrie für erwiesen, so wird man in erster Linie auf eine tumor erzeugende oder tumorlokalisierende Wirkung von Hydroxylaminverbindungen achten müssen und wird daran denken, „die Beziehungen der perniziösen Anämie zum Carcinom“<sup>1)</sup> vielleicht einmal in dem Sinne gelöst zu sehen, daß beide nebeneinandergehende Wirkungen sind eines „endogen gebildeten Giftes von Hydroxylaminstruktur“<sup>2)</sup>, das durch einen pathologischen Oxydationsvorgang z. B. aus Eiweißspaltprodukten entsteht:  $\text{RNH}_2 \rightarrow \text{RNH} \cdot \text{OH}$ .

Über fortgesetzte im Gange befindliche Untersuchungen soll später berichtet werden.

Zur Kritik der angewandten Methodik gilt das gleiche, wie für die Versuche Thunbergs über die Beeinflussung des Gasaustausches des überlebenden Froschmuskels durch verschiedene Stoffe<sup>3)</sup>: „Noch weiter von den natürlichen Bedingungen entfernt man sich, wenn man auf den von den Kapillaren aus vor sich gehenden Gasaustausch verzichtet und das Organ nur durch die Oberfläche atmen läßt . . . Es ist jedoch nicht immer möglich, Durchströmungsmethoden zu verwenden. Wenn man aber die Beziehung der Masse des Organs zu der Oberfläche, wodurch der Gasaustausch statt-

<sup>1)</sup> Pappenheim, *Fol. Hämat.* Bd. XIV, H. 3, S. 329 (1913). A. Heinrichsdorff ebenda S. 359.

<sup>2)</sup> Pappenheim *loc. cit.*

<sup>3)</sup> *Skand. Arch.* Bd. 22, S. 406 (1909).

findet, besonders günstig gestaltet, so daß die inneren Teile des Organs an dem Gasaustausch leicht teilnehmen können, so ist die Methode für verschiedene Zwecke anwendbar . . . Wenn man die Integrität der Organe opfert und sie in kleinere Teile zerteilt, kann man wenigstens für die Muskelzellen bewirken, daß sie ihren vitalen Gasaustausch behalten, obwohl sie die Ausdiffusion der intrazellularen Stoffe und die Eindiffusion beliebiger fremder Stoffe gleichzeitig erlauben. Zuerst haben Battelli und Stern <sup>1)</sup> mitgeteilt, daß man diesen Gasaustausch derart günstig gestalten kann, daß er von derselben Größe wie der normale Gasaustausch ist.“

### Experimentelles.

1. Beschleunigung der Methämoglobinbildung des m-Dinitrobenzols durch Zusatz von Muskulatur verschiedener Tiere.

Frisch entnommenes defibriertes Katzenblut wird zentrifugiert, der Blutkörperchenbrei wird viermal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, möglichst abgetrennt und durch Auffüllen auf das 7fache des ursprünglichen Blutvolumens mit destilliertem Wasser hämolysiert.

Je 5 ccm der Blutlösung werden mit 0,01 g fein gepulvertem Dinitrobenzol und 0,25 g frisch entnommener, mit der Schere fein zerschnittener Extremitätenmuskulatur im Reagenzglas unter öfterem Schütteln gemischt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Zur spektroskopischen Untersuchung wird die Blutlösung jedesmal von den Muskelstückchen vorsichtig in den Beobachtungstrog abgegossen. Als Instrument diente ein großes Gitterspektroskop von Schmidt & Haensch. In allen Fällen wurde darauf geachtet, daß die Lage des eventuell sichtbar werdenden Absorptionsstreifens auch wirklich mit der des Methämoglobinstreifens übereinstimmte:  $\lambda = 620 = 640 \mu\mu$ ; in keinem Falle wurde in vitro ein in seiner Lage abweichender (Dinitrobenzollhämoglobin-)Streifen gemessen.

<sup>1)</sup> Compt. rend., 7. April 1906.

## Blut + Dinitrobenzol.

Zeit	1. + 0,25 g Froschmuskel	2. + 0,25 g Meerschwein- chenmuskel	3. + 0,25 g Kaninchen- muskel	4. ohne Zu- satz
8 Min.	?	—	—	—
10 "	—	—	—	—
13 "	deutl. Streifen	—	—	—
20 "	dunkl. Streifen	—	—	—
22 "		—	—	—
26 "		—	—	—
28 "		deutl. Streifen	—	—
31 "			matter Streifen	—
36 "			deutl. Streifen	—
68 "				—
3 $\frac{1}{2}$ Std.				deutl. Streifen

Ein zweiter Versuch wurde völlig entsprechend angestellt, nur wurden hämolysierte, 1 : 7 verdünnte Kaninchenblutkörperchen benutzt. Je 5 ccm Blutlösung + 0,01 g Dinitrobenzol + 0,25 g Muskulatur von

Zeit	1. Frosch	2. Katze	3. Meer- schweinchen	4. Kaninchen	5. ohne Mus- kelzusatz
11 Min.	—	—	—	—	—
19 "	kräft. Str.	—	—	—	—
27 "	s. dunkl. Str.	?	?	—	—
32 "		s. matt. Str.	?	—	—
36 "			s. matt. Str.	—	—
43 "		deutl. Str.	deutl. Str.	s. matt. Str.	—
2 $\frac{1}{4}$ Std.					—

Der dritte Versuch wurde entsprechend mit gewaschenen hämolysierten Froschblutkörperchen (*rana temporaria*) in der Verdünnung 1 : 5 angestellt. Je 5 ccm Blutlösung + 0,01 g Dinitrobenzol + 0,25 g Muskel von

Zeit	Frosch	Kaninchen
4 "	—	—
6 "	deutl. Streifen	—
11 "	s. kräft. Streifen	?
15 "		s. matter Streifen
25 "		kräftiger Streifen

In diesen Versuchen zeigt sich mit aller Deutlichkeit der ganz allgemein stark beschleunigende Einfluß zugesetzter Muskulatur auf die methämoglobinbildende Wirkung des Dinitrobenzols; weiter treten bereits deutliche Unterschiede in der Wirkung der Muskulatur der verschiedenen Tierspezies hervor; ebenso sind Unterschiede in der Empfindlichkeit der Blutart erkennbar.

Endlich beweist Versuch 3, daß Muskulatur und Blut der gleichen Tierart nicht in der Weise aufeinander eingestellt sind, daß etwa diese Kombination ein Optimum oder Pessimum der Giftwirkung ergäbe, sondern es handelt sich um voneinander unabhängige aber gleichsinnige Differenzierungen. Nach der Beschleunigung durch Muskelwirkung geordnet, ergibt sich die absteigende Reihe: Frosch, Katze, Meerschweinchen, Kaninchen.

Nach der Empfindlichkeit des Blutes geordnet, ergibt sich die Reihe: Frosch, Katze, Kaninchen.

Doch soll damit nicht gesagt sein, daß nicht unter völlig physiologischen Verhältnissen die Glieder dieser Reihen aus hier nicht übersehbaren Gründen sich anders ordnen könnten.

## 2. Reduktion des m-Dinitrobenzols durch Muskulatur zum m-Nitrophenylhydroxylamin.

Achtzehn Esculenten vom mittleren Gewicht von 50 g werden einzeln dekapitiert und verarbeitet; nach Zerstörung des Rückenmarks werden sie enthäutet und durch kurzes Abspülen unter der Wasserleitung möglichst vom Blut befreit.

Dann wird die Ober- und Unterschenkelmuskulatur rasch abpräpariert und in ein Gemisch von 0,5 g fein gepulvertem farblosen m-Dinitrobenzol (F.P. nach 2 maligem Umkristallisieren aus Alkohol 92—93°) und 50 ccm destillierten Wassers hineingeschnitzelt und öfters umgerührt. In gleicher Weise werden die übrigen Frösche einzeln für den Versuch angesetzt und die Bechergläser bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Bereits nach etwa 15—30 Minuten ist Gelbfärbung der Muskelstückchen zu beobachten, die in die wäßrige Lösung hineindiffundiert und nach 2—4 Stunden ihr Maximum erreicht hat. Die gelbe Flüssigkeit wird nach einigem weiteren Stehen dekantiert und gemeinsam durch ein Falterfilter gegossen; ebenso werden die Muskelstücke mittels einer Presse möglichst von Flüssigkeit befreit, noch einmal mit etwa 150 ccm Wasser digeriert und wiederum ausgepreßt; der gelbe Preßsaft wird gleichfalls filtriert. Eine Probe der braunstichig gelben Filtrate gibt bei Zusatz von wenig Sodalösung eine allmählich verblässende kräftige Violettfärbung, bei Zusatz von 1 Tropfen Ammoniak eine Purpurfärbung, die beide bei Ansäuern wieder in Gelb umschlagen. Eine andere Probe, angesäuert und mit wenig verdünnter Natriumnitritlösung versetzt, wird in sodaalkalisch-alkoholische  $\alpha$ -Naphthollösung gegossen, wobei keine Diazoreaktion auftritt, sondern höchstens die schwache Rosafärbung, die von der alkalischen Reaktion herrührt. Ebenso ergibt die Kuppelung mit  $\beta$ -Naphtholsulfosäure nach Ammoniakzusatz keine Diazoreaktion. Mit Eisenchlorid: keine Färbung; ammoniakalische Silberlösung wird bei Erwärmen reduziert. 5 ccm defibriniertes, durch Verdünnen 1:7 mit destilliertem Wasser hämolysiertes Blut zeigt nach Zusatz von 0,5—1 ccm des gelben Muskelfiltrates in 1—2 Minuten einen deutlichen Methämoglobinstreifen. Daß reiner Muskelpreßsaft kein Methämoglobinbildungsvermögen hat, wurde ausdrücklich festgestellt.

Die vereinigten gelben Filtrate werden mit Äther 2- bis 3mal ausgeschüttelt, der sich dabei gelb färbt, während die wäßrige Schicht farblos zurückbleibt. Der Äther wird zuerst freiwillig verdunsten gelassen, dann im Vakuumexsikkator

über Paraffin und  $P_2O_5$  verdampft; es hinterbleiben ca. 0,4 g Kristalle, die mit gelbbraunem Öl getränkt sind. Da die Trennung von den Dinitrobenzolkristallen und Kristallisation des Öles wegen der geringen Menge nicht gelang, wurde es in folgender Weise als m-Nitrophenylhydroxylamin identifiziert: Eine Probe des Gemisches wird in Alkohol gelöst und tropfenweise mit Fehlingscher Lösung versetzt, die in der Kälte sofort reduziert wird.

Eine andere Probe mit n- $H_2SO_4$  verrieben, mit sehr wenig Natriumnitritlösung versetzt und in soda-alkoholische  $\alpha$ -Naphthollösung gegossen, gibt keine Rotfärbung.

Eine dritte Probe zu 5 ccm 1:7 verdünntem Blut gesetzt, ruft starke Methämoglobinbildung hervor.

Die Hauptmenge der ölgetränkten Kristalle wird mit 3 ccm 60%iger Schwefelsäure auf dem lebhaft siedenden Wasserbad erhitzt, wobei sich die Lösung schwarzbraun färbt; nach  $1\frac{1}{2}$  Stunden wird abgekühlt, mit 5 ccm Wasser verdünnt und von dem reichlichen schwarzbraunen Rückstand abfiltriert. Die völlig klare dunkelgelbe Flüssigkeit wird vorsichtig mit Ammoniak und Essigsäure neutralisiert, wobei die Farbe in Rot umschlägt und Abscheidung eines gelbbraunen in Nadeln kristallisierenden Niederschlages beginnt. Nach mehrstündigem Stehen im Eisschrank wird von dem Niederschlage abfiltriert und das rotgefärbte Filtrat mit Äther nochmals ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wird im Vakuumexsikkator verdampft, wobei dunkelgelbes Öl zurückbleibt. Es wird mit kalter n-Schwefelsäure durchgerieben und möglichst gelöst. Das klare gelbe Filtrat gibt mit überschüssigem Ammoniak eine kräftige Rotfärbung, die nicht beim Ausschütteln in Äther geht, eine andere Probe mit wenig Natriumnitrit versetzt und in soda-alkoholische  $\alpha$ -Naphthollösung gegossen, gibt eine prachtvolle Diazoreaktion.

Die oben erwähnten abgeschiedenen gelbbraunen Kristallnadeln lösen nur zum kleinen Teil wieder in verdünnter Säure, das saure gelbe Filtrat von ihnen gibt gleichfalls eine, wenn auch schwächere Diazoreaktion.

Die drei gefundenen Tatsachen: Löslichkeit in verdünnter

Säure mit gelber Farbe, starke Azofarbstoffbildung und Salzbildung mit Alkalien unter Rotfärbung sprechen für Vorhandensein eines Nitroaminophenols, entstanden aus Nitrophenylhydroxylamin durch die umlagernde Wirkung der 60%igen  $H_2SO_4$ .

Den entsprechenden Versuch mit reinen Substanzen beschreibt K. Brand<sup>1)</sup>; ich habe mich jedoch gleichfalls durch Umlagerungsversuche mit reinem m-Nitrophenylhydroxylamin davon überzeugt, daß die Reindarstellung des entsprechenden 2-Nitro-4-amino-1-phenols nur bei größeren Mengen möglich ist, — nicht aber mit Milligrammengen, um die es sich hier handelt.

Zur weiteren Charakterisierung der aus dem Dinitrobenzol durch die Wirkung von Gewebe entstehenden methämoglobinbildenden Substanz wird ein zweiter völlig gleicher Versuch mit Froschmuskulatur angesetzt und verarbeitet. Die nach Verdunsten des Äthers hinterbleibenden, mit gelbem Öl getränkten Kristalle werden diesmal jedoch in wenig Alkohol kalt gelöst und allmählich zu einer wäßrigen Eisenchloridlösung zugefügt. Der beim Erhitzen der mißfarbenen Mischung auftretende äußerst stechende Geruch und die Gelb-Grünfärbung des ersten Anteils des Destillates zeigen das Vorhandensein von m-Nitronitrosobenzol an, entstanden aus m-Nitrophenylhydroxylamin durch Oxidation. Ein Kontrollversuch mit einer alkoholischen Lösung von m-Dinitrobenzol, die in Eisenchloridlösung gegossen und mit Wasserdampf destilliert wurde, blieb farblos und zeigte nur Aldehydgeruch. Übrigens läßt sich das Auftreten von Nitronitrosobenzol auch direkt nachweisen, indem man eine nicht zu geringe Menge des von der Muskulatur getrennten gelben Filtrats mit reichlich  $FeCl_3$  versetzt und aus einem geräumigen Kolben mit Wasserdampf destilliert, wobei der Kolbeninhalt sich rotbraun färbt. Man erhält rasch ein smaragdgrün gefärbtes, stechend riechendes Destillat, das durch Farbe und Geruch Nitronitrosobenzol verrät und übrigens

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. Bd. 38, 4. S. 4006 (1905).

auch Dinitrobenzol, aber keine Aminoverbindung enthält, was durch Fehlen der Diazoreaktion nach Kuppelung mit  $\alpha$ -Naphthol festgestellt wurde.

Auch in diesem Falle habe ich mich davon überzeugt, daß es zwar möglich ist, durch Oxydation von 0,25 g Nitrophenylhydroxylamin ein reines Präparat von Nitronitrosobenzol zu gewinnen, daß aber aus einem Gemisch bereits von 0,1 g Nitronitrosobenzol und 0,25 g Dinitrobenzol durch Wasserdampfdestillation keine glatte Trennung der Substanzen mehr zu erzielen ist und mehrmaliges Destillieren der verschiedenen Fraktionen bereits wegen der geringen Mengen auf Schwierigkeiten stößt.

Trotzdem erscheint der Nachweis von m-Nitrophenylhydroxylamin durch den Nachweis von Nitroaminophenol nach Erhitzen mit Säure, den Nachweis von Nitronitrosobenzol nach Behandeln mit  $\text{FeCl}_3$ , die starke Reduktion kalter Fehlingscher Lösung und ammoniakalischer Silberlösung, die starke Gelbfärbung, die auf Alkalizusatz in Violett umschlägt, gesichert. Dazu kommt dann die sehr charakteristische Einwirkung auf Blut, die allen anderen noch in Betracht kommenden Umwandlungsprodukten des m-Dinitrobenzol fehlt, die aber dem reinen m-Nitrophenylhydroxylamin in höchstem Maße eigen ist, wie im folgenden gezeigt werden wird.

### 3. Darstellung von m-Nitrophenylhydroxylamin<sup>1)</sup>.

Will man sich nur rasch eine Lösung herstellen, die gewisse Mengen des Hydroxylaminkörpers neben anderen Produkten enthält, die aber gleichwohl seine charakteristischen Reaktionen<sup>2)</sup> gibt, so löst man 1 Teil Chlorammonium und 2 Teile Dinitrobenzol in 36 Teilen heißem 60%igen Alkohol

<sup>1)</sup> An dieser Stelle habe ich die angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Lorenz, in dessen Institut ich die Elektroreduktion ausführte, für die Bereitwilligkeit ergebenst zu danken, mit der er mir seine Hilfsmittel und seinen Rat zur Verfügung stellte, ebenso seinem Assistenten, Herrn Professor Fränkel.

<sup>2)</sup> Wohl. Pat. Nr. 84138 (1895) Friedländer Bd. IV, S. 44. Kalle, Pat. Nr. 89978 (1996) Friedländer Bd. IV, S. 47.

und behandelt die Lösung bei Wasserbadhitze wenige Minuten mit verkupferem Zinkstaub unter kräftigem Schütteln, wobei sich die Lösung sehr rasch dunkelgelb färbt. Nach Erkalten und Abgießen gibt die klare Lösung mit Alkalien oder Soda intensive unbeständige Violettfärbung, reduziert Silberlösung momentan in der Kälte und wandelt den Blutfarbstoff augenblicklich in eine braune Wolke von Methämoglobin um. Die einzige bisher erprobte Methode jedoch zur Reindarstellung des Körpers ist die elektrochemische Reduktion nach Brand<sup>1)</sup>, die bei Anwendung von 25 g reinstem m-Dinitrobenzol, 8–10 Volt Spannung und 990 Ampèreminuten glatt zum Ziele führte.

Die am Schluß vorhandene tief gelbe alkoholische Reaktionslösung reduzierte Silbernitrat in der Kälte und gab bei Zusatz von Soda intensive Violettfärbung, gleichwohl kommt aber diese Reaktion der Lösung der reinen Kristalle nur in ganz geringem Maße zu, obwohl Brand selbst angibt: „Natronlauge, Soda und Ammoniak verändern die Substanz sofort, indem die Lösung blauviolette bis braune Farbe annimmt, die bald wieder verschwindet“.

Nach mehrmaligem Umlösen der nach Brand erhaltenen gelben Kristalle aus Benzol unter Zusatz von Tierkohle schmolz der Körper ohne Sintern bei 118–119° (unkorr.) und kristallisierte dann aus Benzol in Form gelber harter Drusen, die unter dem Mikroskop als feine zentrisch geordnete gebogene Nadeln erkennbar sind. Eine wäßrig-alkoholische Lösung erleidet durch Soda Zersetzung ohne charakteristische Färbung unter Bildung eines flockigen Niederschlages, — mit NH<sub>3</sub> entsteht bläuliche Opaleszenz, dann ein flockiger weißer Niederschlag, mit Natronlauge eine vorübergehende Purpurfärbung.

Eine alkoholische Lösung reduziert Silbernitratlösung in der Kälte rasch unter Spiegelbildung, ebenso wird Fehling'sche Lösung augenblicklich reduziert.

Eine wäßrig-alkoholische Lösung angesäuert, mit wenig Natriumnitrit versetzt und in soda-alkoholische  $\alpha$ -Naphtholösung gegossen, zeigt keine Diazoreaktion.

<sup>1)</sup> loc. cit.

**Wirkung auf Oxyhämoglobin:** 5 ccm defibriniertes und 1:7 verdünntes Kaninchenblut mit 0,5 ccm einer wäßrig-alkoholischen 0,2‰igen Nitrophenylhydroxylaminlösung bei 20° versetzt, zeigt nach 2 Minuten eben erkennbaren Methämoglobinstreifen, bei entsprechendem Zusatz von 0,5 ccm einer 0,4‰igen Lösung ist bereits nach einer Minute der Methämoglobinstreifen erkennbar.

Vergleichende Übersicht über die Eigenschaften der durch Muskelwirkung aus Dinitrobenzol entstandenen Substanz und reinem m-Nitrophenylhydroxylamin.

	Substanz im Muskelfiltrat	m-Nitrophenylhydroxylamin
Farbe:	gelb	gelb
Fehlingsche Lösung	in der Kälte Reduktion	in der Kälte Reduktion
2 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	schwer löslich	schwer löslich
Soda	rotviolett (unbeständig)	Zersetzung <sup>1)</sup>
NH <sub>3</sub>	purpurrot (unbeständig)	bläuliche Opaleszenz <sup>1)</sup>
Diazoreaktion	—	—
Blut	starke Methämoglobinbildg.	starke Methämoglobinbildg.
FeCl <sub>3</sub> :Destillat	grün, riecht stechend	grün, riecht stechend
		Kristalle von Nitronitrosobenzol
60% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> bei 100°	Der säurelösliche Teil mit NH <sub>3</sub> neutralisiert: Farbumschlag in Rot. Diazoreaktion stark positiv	Der säurelösliche Teil +NH <sub>3</sub> : rot. Diazoreaktion ++ Kristalle von 2-Nitro-4-amino-1-phenol

<sup>1)</sup> Die auffallende Erscheinung, daß sowohl bei der chemischen Darstellung des Nitrophenylhydroxylamins als bei seiner biochemischen Entstehung die Reaktionslösungen auf Sodazusatz eine intensive Violettfärbung geben — nicht aber die abgeschiedene Substanz —, ist bisher ungeklärt. Ob es sich dabei um zwei physikalisch oder strukturell verschiedene Substanzen (Tautomere) handelt, werden noch fehlende Untersuchungen vielleicht entscheiden. Jedenfalls geht die Violettfärbung mit der Bildung des Nitrophenylhydroxylamins und seinem Wirksamwerden gegenüber Blut einher und verschwindet gleichzeitig mit ihr. Läßt man nämlich die mit wenig Soda versetzte violette Reaktionslösung bis zum Verschwinden der Färbung stehen, so übt sie keinerlei Wirkung mehr auf Oxyhämoglobinblut aus.

## 4. Blutwirkung und Erkennungsreaktionen von Nitro-

Substanz	Lösung in Prozent	2 n H <sub>2</sub> S <sub>1</sub>	NH <sub>3</sub>	FeCl <sub>3</sub>
m-Nitroso- nitrobenzol	0,25 (i. 50% Alkoh.) 0,15	schwer lösl.	—	—
m-Nitrophenyl- hydroxylamin	0,02 (i. 20% Alkoh.) 0,04	"	Zersetzung	Zersetzung
m-Nitranilin	0,25 (Wasser)	farblos gelöst	—	—
m-Phenyl- diamin	1	"	—	—
m,m-Diamino- azoxybenzol	0,25	"	—	—
Nitroamino- phenol 1, 3, 4	0,25	"	tiefrot	Niederschlag
1, 3, 6	0,25 (10% Alkoh.)	"	"	"
1, 3, 2 (vicin.)	0,25 (20% Alkoh.)	"	"	rotbraun
1, 3, 5 (symm.)	0,25 (10% Alkoh.)	"	—	gelbbraun
Nitrosobenzol	0,25 (30% Alkoh.)	—	—	—

Man erkennt aus dieser Tabelle das alle andern Substanzen weit über-  
treffende Methämoglobinbildungsvermögen der Hydroxylaminverbindung und  
besonders die sehr geringe Blutwirkung der Nitroaminophenole, die im Verein  
mit ihrer Säurelöslichkeit und kräftigen Diazoreaktion ihr Entstehen durch  
Muskelwirkung und ihre toxische Bedeutung ausschließt. Ebenso besteht

Umwandlungsprodukten einiger aromatischer Körper<sup>1)</sup>.

Diazoreakt. m. $\alpha$ -Naphthol	Ammon.-Ag-Lösg.	Methämoglob.-Bldg. mit 5 ccm (1 : 7 verd.) Kan.-Blut
—	wird in Kälte reduziert	1 ccm : nach 1½ Min. sehr starke Dunkel- färbg. deutl. Methämogl.-Streifen. 0,5 ccm : nach 2 Min. sehr starke Dunkel- färbg. undeutl. Methämogl.-Streifen. 0,1 ccm : nach 10 Min. —
—	,	0,5 ccm : nach 2 Min. erkennb. Methäm.- Streifen. 0,5 ccm : nach 1 Min. erkennb. Methäm.- Streifen.
stark	wird in Wärme reduziert	1 ccm : nach 1¼ Std. —  0,25 " : " ½ Std. —
,	,	0,5 " : " 3 Std. —
,	,	1 " : " 15 Min. ? " " 20 Min. Methäm.-Streifen.
,	wird in Kälte reduziert	1 " : " 25 Min. —
,	wird in Wärme reduziert	1 " : " 11 Min. — " " 20 Min. Methäm.-Streifen.
,	,	1 " : " 60 Min. —
—	—	1 " : sofort sehr starke Dunkel- färbg.; nach Aufhellen durch Verdünn. kein Methäm.-Str. 0,3 " : allmählich Dunkelfärbg.; kein Methäm.-Streifen.

die starke Einwirkung der Nitroverbindungen auf Blut der Hauptsache nach nicht in einer Umwandlung des Hämoglobins in Methämoglobin.

<sup>1)</sup> Für ihre frdl. Überlassung bin ich der Fa. L. Cassella & Co., und speziell Herrn Dr. Benda, zu größtem Dank verpflichtet.

### 5. Vergleichende Versuche über die Reduktionskraft von Muskulatur verschiedener Tiere.

a) Einem 1800 g schweren Kaninchen wird in leichter Narkose ein Stück aus dem *Musculus glutaeus maxim.* unter möglicher Einschränkung von Blutungen herausgeschnitten und sofort in 40° warmer Lockescher Lösung durch Schütteln abgespült, rasch mit Filtrierpapier abgetupft, noch einmal abgespült, abgetupft und davon 5,2 g in ein auf 40° vorgewärmtes Gemisch von 0,3 g reinem gepulvertem Dinitrobenzol und 30 ccm Lockescher Lösung hineingeschnitzelt. Dauer der Operation etwa 5 Minuten. Das bald sich hellgelb färbende Gemisch bleibt im Brutschrank stehen.

b) In gleicher Weise wird von einer äthernarkotisierten Katze 6,0 g Muskelfleisch in ein gleichartiges Gemisch von Dinitrobenzol und Lockescher Lösung hineingeschnitten und im Brutschrank stehen gelassen.

c) Dieselbe Operation am Meerschweinchen: 5,3 g Muskulatur.

Man erkennt bald an der Intensität der Gelbfärbung, daß die Reaktion mit dem Katzenmuskel rascher vor sich geht als mit dem Kaninchenmuskel und noch übertroffen wird von dem zuletzt angesetzten Versuch mit Meerschweinchenmuskel.

4 1/2 Stunden nach Beginn jeden Versuches wird von den Muskelstücken und dem unverbrauchten Dinitrobenzol abfiltriert und die beim Stehen und Abkühlen sich noch etwas trübende Flüssigkeit noch einmal filtriert. Ein Vergleich der drei Filtrate ergibt, daß das vom Kaninchen deutlich heller gelb ist als das der anderen Tiere; gleichfalls erscheint die violette Farbe gleicher Filtratmengen nach Sodazusatz im Falle des Kaninchens unzweideutig am hellsten.

Am anschaulichsten läßt sich der quantitative Vergleich der entstandenen Nitrophenylhydroxylaminmengen dadurch gestalten, daß man beobachtet, wann der durch eine bestimmte Menge zu Blut gesetzten Filtrats erzeugte Methämoglobinstreifen zuerst erkennbar wird. Innerhalb einer bestimmten engen Konzentrationszone des Blutgiftes nämlich besteht Pro-

portionalität zwischen der Giftmenge und der bis zum Auftreten des Methämoglobinstreifens verstrichenen Zeit. Man arbeitet also mit Grenzwerten, die aber für vergleichende Messungen brauchbar sind. Für derartige vergleichende spektroskopische Beobachtungen hat sich folgende Versuchsanordnung als zweckmäßig erwiesen, die aus der schematischen Zeichnung (Fig. 2) klar wird.

Man erkennt ohne weiteres, daß im Okular zwei Spektren erscheinen: das obere, von der hinteren Lichtquelle mit direktem Strahlengang herrührend, und das untere, das von der seitlichen Lichtquelle erzeugt wird; deren Strahlen nun passieren je nach der Stellung des Schlittens, der in einer Vertiefung des Spektroskopiertisches läuft, entweder Beobachtungstrog 1 oder 2, in denen sich die Vergleichungslösungen befinden. Um auch den schwächsten Methämoglobinstreifen in ihnen noch sicher beobachten zu können, bleibt Beobachtungstrog 0 stets mit Oxyhämoglobinblut der entsprechenden Verdünnung gefüllt.

5 ccm Blut + 0,5 ccm Filtrat vom Muskel von

	Kaninchen	Katze	Meerschweinchen
Methämoglobin-Streifen nach 5 ccm Blut + 0,25 ccm Filtrat:	2.2 Min.	1.3 Min.	1,4 Min.
Methämoglobin-Streifen nach 5 ccm Blut + 0,1 ccm Filtrat:	4,2 "	2,5 "	2,9 "
Methämoglobin-Streifen nach	11.5 "		6,0 "

#### Wiederholung des Versuchs.

Entnahme von 5,0 g Kaninchenmuskulatur aus dem *Musculus glutaeus maxim.*, 5 g Oberschenkelmuskulatur vom Meerschweinchen und 5 g Muskulatur von den hinteren Extremitäten einer *Rana temporaria*. Nach möglichster Befreiung von Blut werden die beiden ersten Muskelarten in ein 40° warmes Gemisch von 0,3 g Dinitrobenzol und 30 ccm Lockescher Lösung eingetragen, die Froschmuskulatur in das entsprechende

Gemisch von Dinitrobenzol und destilliertem Wasser ( $18^{\circ}$ ). —  
 Nach 4 Stunden werden alle drei Reduktionsansätze durch  
 ein trockenes Filter gegossen und die Filtrate verglichen: das

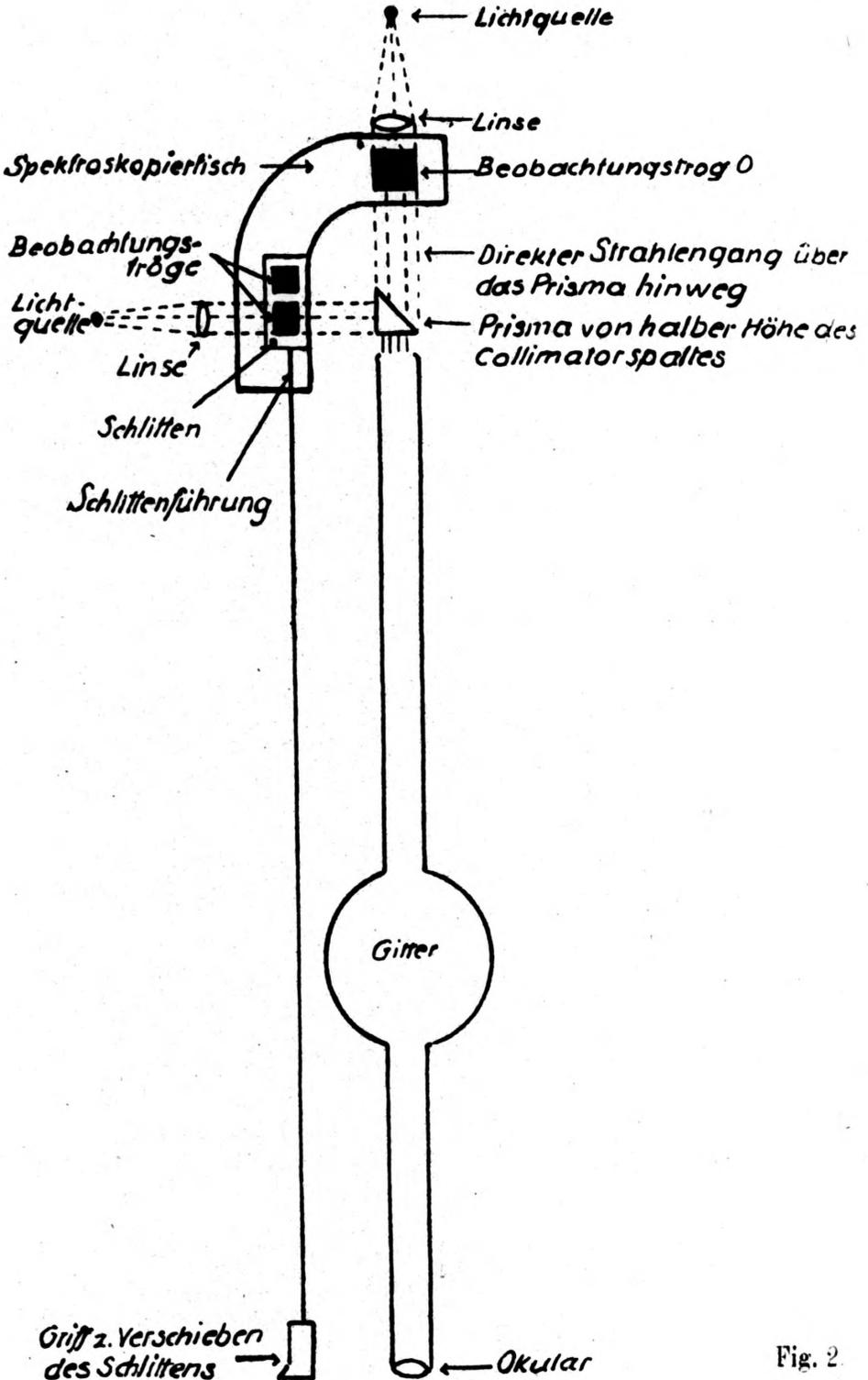


Fig. 2.

vom Kaninchen ist blaßgelb, vom Meerschweinchen ziemlich kräftig gelb, vom Frosch intensiv goldgelb.

Je 5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut vom ursprünglichen Hämoglobingehalt: 54% (nach Sahli) + 0,25 ccm Filtrat

	Kaninchen	Meerschweinchen	Frosch
Methämogl.-Str. nach . . .	mehr als 20 Min.		7 Min.
" " " . . .	weniger als 60 "		
5 ccm Blut + 0,5 ccm Filtrat:			
Methämogl.-Str. nach . . .	15 "	10 Min.	2,5 "

Aus beiden Versuchen ergibt sich folgende Tierreihe, nach der Stärke der Muskelreduktionskraft geordnet: Frosch, Katze, Meerschweinchen, Kaninchen.

Wir sind uns bewußt, daß sich gegen Aufstellung einer solchen Reihe der Einwand machen läßt, die außerordentlich unphysiologischen Verhältnisse verböten einen für die intakten Lebensvorgänge gültigen Vergleich; eine Handhabe für einen solchen Einwand bietet sogar die von Verzár<sup>1)</sup> aufgestellte vergleichende Tabelle über die Gaswechselruhowerte von Frosch- und Warmblütermuskeln. Allein es ist zu bedenken, daß wenigstens die verschiedenen Warmblütermuskeln unter annähernd gleich abnormen Verhältnissen jenes verschiedene Reduktionsausmaß bewirken, und es ist zu erwarten, daß mit der weiter fortschreitenden Bestimmung der wahren physiologischen Gaswechselwerte zwar Umstellungen der Tierspezies als Glieder derartiger Reihen nötig werden können, daß aber

<sup>1)</sup> Ergebn. d. Physiol. Bd. 15, S. 1 (1916); vgl. auch ebenda S. 75 Anm.: „Nach P. Bert ist bei ausgeschnittenen Organen der Gaswechsel am stärksten bei Muskeln. Ebenso fanden Battelli und Stern, daß der Muskelbrei nahezu am meisten atmet. Die Methode berechtigt aber kaum dazu, ihre Resultate auf den Körper zu übertragen.“ — Andererseits schlossen Röhrig und Zuntz aus Berechnungen, daß in den Muskeln „absolut der größte Teil der Oxydationsprozesse zu suchen sei“. Berl. klin. Wochenschr. Bd. 141 (1878); Pfüg. Arch. Bd. IV, S. 57 (1871).

Differenzen der Gewebsatmung bleiben werden. Wie eine Spezifität des Eiweißmoleküls nach Tierart — ja nach Tierindividuum besteht, so wird sich später eine Spezifität der Zellfunktionen nach ihrer quantitativen Seite hin entsprechend der Tierart und dem Individuum erweisen und zur Basis u. a. der sog. Krankheits„disposition“ werden<sup>1)</sup>.

Besonders schlagend illustriert noch folgender Versuch die ganz verschiedene Empfindlichkeit der Tierarten gegenüber dem Dinitrobenzol: 0,25 ccm Filtrat vom Kaninchenmuskelsversuch werden zu 5 ccm des 1 : 7 verdünnten Kaninchenblutes hinzugefügt; ebenso 0,25 ccm Filtrat vom Meerschweinchenmuskelsversuch zu 5 ccm 1 : 7 verdünnten Meerschweinchenblutes, dessen Hämoglobingehalt (nach Sahli) 54% betrug, also fast identisch mit dem des Kaninchenblutes (56%) war.

Zeit	Kaninchen	Meerschweinchen
nach 1 Min.	—	deutl. Methämogl.-Str.
„ 6 „	—	sehr dunkl. Methämogl.-Str.
„ 60 „	ziemlich kräftiger	breiter schwarzer Methämogl.-Str.

Beim Vergleich mit dem oben dargestellten zeitlichen Erscheinen des Methämoglobinstreifens im Kaninchenblut durch Meerschweinchenfiltrat wird bereits die dritte Komponente des „individuellen Giftfaktors“, die wechselnde Reaktionsstärke des giftempfindlichen Organes, erkennbar.

#### 6. Die nach der Tierart verschiedene Blutempfindlichkeit gegen das „direkte“ Blutgift.

Wirkung von reinem m-Nitrophenylhydroxylamin auf defibriniertes hämolysiertes 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut.

<sup>1)</sup> Disposition zur Dinitrobenzolerkrankung: Merkbl. f. Ärzte über Vergiftungen beim Arbeiten mit nitrierten arom. Kohlenwasserstoffen etc. (Kaiserl. Gesundheitsamt, Springer, Berlin 1918.)

ccm	Nitrophenylhydroxylamin- lösung	ccm Blut	Methämogl.-Streifen
0,5	0,1‰ in 10% Alkohol	5	nach 8 Min. — " 12 Std. (matt)
0,15	0,2‰ " 20% "	5	" 18 Min. (sehr matt)
0,25	0,2‰ " 20% "	5	" 12 " (matt)
0,50	0,2‰ " 20% "	5	" 2 " (matt)
0,75	0,2‰ " 20% "	5	" 1 " (matt)
0,5	0,4‰ " 20% "	5	" 1 " (matt, deutl.)

Vergleich von defibriniertem 1 : 7 verdünnten Blut verschiedener Tierarten in seiner Veränderung durch 0,2‰ Nitrophenylhydroxylaminlösung (20% Alkohol):

Je 0,5 ccm . . . Hydroxylaminlösung zugesetzt zu je 5 ccm Blut vom

Methämogl.-Streifen	Kaninchen	Meer- schweinchen
nach 1 Min.	—	deutlich
" 2 "	matt aber deutl.	intensiv
" 5 "	" " "	"

Je 0,25 ccm . . . Hydroxylaminlösung zugesetzt zu je 5 ccm Blut vom

Methämogl.-Streifen	Kaninchen	Meer- schweinchen
nach 1 Min.	—	matt
" 2 "	—	deutlich
" 3 "	—	ganz deutlich
" 7 "	—	kräftig
Wiederholung:		
" 1/2 "	—	sehr matt
" 1 "	—	deutlich
" 3 "	—	ganz deutlich

(beide von ursprüngl. dem gleichen Hämoglobingehalt).

Je 0,25 ccm . . . Hydroxylaminlösung zugesetzt zu je 5 ccm Blut von:

Methämogl.-Streifen	Kaninchen	Katze
nach $\frac{1}{2}$ Min.	—	—
" 2 "	—	fraglich
" $3\frac{1}{2}$ "	—	deutlich
" 6 "	—	völlig deutlich
" 9 "	—	
Wiederholung:		
" $\frac{1}{2}$ "	—	—
" 1 "	—	—
" $1\frac{1}{2}$ "	—	undeutlich
" 3 "	—	erkennbar
" $3\frac{1}{2}$ "	—	deutlich
" 5 "	—	

Je 0,25 ccm . . . Hydroxylaminlösung zugesetzt zu je 5 ccm Blut von:

Methämogl.-Streifen	Kaninchen	Hammel
nach 1 Min.	—	—
" 2 "	—	fraglich
" 3 "	—	matt
" 7 "	—	deutlich

Vergleich von verschiedenartigen gewaschenen hämolytierten Blutkörperchen gegenüber dem Blutgift:

Zur Prüfung der Frage, ob das Serum der verschiedenen Blutarten die verschieden schnelle Methämoglobinbildung durch zugesetztes m-Nitrophenylhydroxylamin verursache, werden je dreimal zentrifugierte und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschene Blutkörperchen mit destilliertem Wasser hämolytiert und auf eine Flüssigkeitsmenge aufgefüllt, die das Siebenfache der ursprünglichen Blutmenge betrug.

Je 0,25 ccm 0,2<sup>0</sup>/<sub>00</sub> Nitrophenylhydroxylaminlösung zugesetzt zu je 5 ccm Blutlösung von:

Methämogl.-Streifen	Kaninchen	Hammel
nach 1 Min.	—	deutlich
" 2 "	matt	sehr kräftig
" 3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "	zieml. deutlich	dunkel

dasselbe mit je 0,20 ccm . . . Hydroxylaminlösung:

nach 1 Min.	—	deutlich
" 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "	matt	kräftig

dasselbe mit je 0,15 ccm . . . Hydroxylaminlösung:

nach 1 Min.	—	matt aber deutl.
" 2 "	—	
" 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "	sehr matt	
" 3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "	" "	deutlich

dasselbe:

nach 1 Min.	—	—
" 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "	—	fraglich
" 2 "	—	matt

Je 0,15 ccm . . . Hydroxylaminlösung zugesetzt zu je 5 ccm Blutlösung von:

Methämogl.-Streifen	Kaninchen	Katze
nach 1 Min.	—	matt
" 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "	—	deutlich
" 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "	fraglich	
" 3 "	sehr matt	ganz deutlich

Die Versuche zeigen, daß im Falle des Kaninchens eine Lösung von serumhaltigem Blut nicht unwesentlich widerstandsfähiger gegen das methämoglobinbildende Gift ist, als von gewaschenen Blutkörperchen, — daß aber für die Verschiedenheit der Methämoglobinbildung gleich vorbehandelter verschiedener Blutarten das Serum keine Rolle spielt.

Nachweis, daß der Hämoglobingehalt nicht für die verschiedene Umwandlungsgeschwindigkeit in Methämoglobin verantwortlich ist:

Defibriniertes Kaninchenblut vom Hämoglobingehalt 48% (nach Sahli) und defibriniertes Hammelblut vom Hämoglobingehalt 58% werden 1 : 7 verdünnt.

Zu je 5 ccm der Blutlösung wird 0,15 ccm einer 0,2% Nitrophenylhydroxylaminlösung zugesetzt.

Methämogl.-Streifen	Kaninchen	Hammel
nach 2½ Min.	—	—
" 6 "	—	fraglich
" 8 "	—	sehr matt
" 13 "	fraglich	matt aber deutl.
" 18 "	sehr matt	deutlich

dasselbe mit 0,25 ccm . . . Hydroxylaminlösung:

nach ½ Min.	—	—
" 2 "	—	matt
" 6 "	—	deutlich
" 9 "	—	deutlich

Nun wird das Hammelblut 1 : 12 verdünnt und mit dem 1 : 7 verdünnten Kaninchenblut verglichen:

Je 5 ccm Blutlösung + 0,25 ccm . . . Hydroxylaminlösung.

Methämogl.-Streifen	Kaninchen	Hammel
nach 1 Min.	—	—
" 2½ "	—	sehr matt
" 4 "	—	zieml. deutlich
" 16 "	deutlich	kräftig
Wiederholung:		
" 12 "	matt	deutlich

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Art des Blutkörpercheninhalts die verschiedene Schnelligkeit der Umwandlung in Methämoglobin bedingt, aber weder das Serum noch der Hämoglobingehalt.

## 7. Versuche zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus.

Wirkung von überlebendem reizbaren Kaninchenmuskel<sup>1)</sup>.

Von einem aufgespannten Kaninchen wird in leichter Äthernarkose der linke Musculus tibialis ant. präpariert, herausgeschnitten und rasch in 40° warmer sauerstoffdurchperlter Lockescher Lösung an Häkchen befestigt, die gleichzeitig als Reizelektroden dienen. Als Reaktionsgefäß dient ein nicht zu weiter Glaszylinder, dessen Boden durch einen doppelt durchbohrten Kork gebildet wird; oben ist er gleichfalls mit einem Korken locker verschlossen, der den Stromzuführungs-

draht und damit das obere Muskelende ganz leicht fixiert. Der Zylinder wird mit etwa 20 ccm Lockescher Lösung und 0,5 g Dinitrobenzolphpulver beschickt und ist dann etwa zu  $\frac{4}{5}$  gefüllt. Die Sauerstoffblasen wirbeln gleichzeitig das feingepulverte Dinitrobenzol auf und bewirken gleichmäßige Berührung des Muskels mit ihm. Alle 5 Sekunden erfolgt durch Strom-

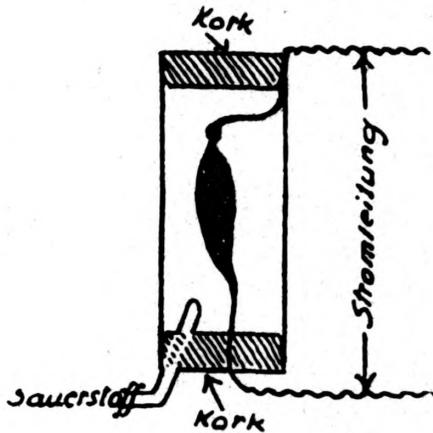


Fig. 3.

schluß faradische allmählich verstärkte Reizung, wobei — allmählich schwächer werdende — Zuckungen erfolgen. Bereits nach 45 Minuten: Hellgelbfärbung der Lösung, die nach 1½ Stunden ganz deutlich ist. Da zu dieser Zeit auch die Reizbarkeit des Muskels erlischt, wird der Versuch abgebrochen und die Lösung filtriert. Sie gibt mit einem Tropfen Ammoniak eine Rosafärbung.

5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 0,5 ccm Filtrat zeigt nach 5 Minuten einen deutlichen Methämoglobinstreifen.

<sup>1)</sup> Diese Versuchsanordnung ist einer von Herrn Professor O. Rießer am hiesigen Institut ausgearbeiteten nachgebildet; er wird demnächst darüber berichten.

Wiederholung des Versuches unter gleichen Bedingungen, jedoch mit nur alle 15 Sekunden erfolgter, 70 Minuten fortgesetzter Reizung ergibt das gleiche Resultat:

4 ccm Blut + 2 ccm Muskelfiltrat:

Methämogl.-Streifen nach  $2\frac{1}{2}$  Min. matt

„ „ „  $3\frac{1}{2}$  „ deutlich.

Es zeigt sich also, daß die Reduktion des Dinitrobenzols eintritt, während der überlebende Muskel noch reizbar ist.

Wirkung blutfrei gewaschener Muskulatur.

Ein Wasserfrosch wird dekapitiert; dann werden seine unteren Extremitäten von der Bauchorta aus mit Ringerlösung durchspült, bis sie aus der durchschnittenen Bauchvene völlig farblos abläuft. Die beiden blutfrei erscheinenden Gastrocnemii werden in ein Gemisch von Wasser und Dinitrobenzol hineingeschnitzelt. Bald tritt Gelbfärbung der Lösung ein; das Filtrat gibt mit Soda eine Purpurfärbung; mit verdünntem Kaninchenblut tritt nach 2 Minuten Methämoglobinbildung ein.

Schädigung und Zerstörung der Zellstruktur.

Die Muskulatur der einen hinteren Extremität einer *Rana temporaria* wird unmittelbar nach dem Dekapitieren in eine Mischung von 0,5 g Dinitrobenzol und 30 ccm Wasser hineingeschnitzelt, die Muskulatur der andern Seite wird rasch aber kräftig mit Quarzsand verrieben und dann in ein Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol und 20 ccm Wasser eingetragen. Trotz der höheren Konzentration der miteinander reagierenden Körper färbt sich die letzte Mischung viel langsamer und schwächer gelb, als die der nicht mit Quarzsand behandelten Muskulatur.

Drei<sup>1)</sup> Eskulenten werden dekapitiert, die Extremitätenmuskeln von jeder rasch abgeschnitten, in flüssigen Stickstoff

<sup>1)</sup> Bei Gelegenheit dieser Versuche spreche ich Herrn Prof. Dr. Embden für die in seinem Institut mir freundlichst gebotene Hilfe und Überlassung von Trockenhefe (vgl. spätere Versuche!) meinen ergebensten Dank aus.

getaucht, in gekühlter Reibschale zu Pulver zerrieben und in ein Gemisch von je 0,5 g Dinitrobenzol und 20 ccm destilliertem Wasser geschüttet und öfters umgerührt. Nach 6stündigem Stehen bei Zimmertemperatur stellen alle drei Ansätze einen dünnen grauen Muskelbrei dar, von dem abfiltriert wird.

5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 0,5 ccm des fast farblosen Filtrates zeigt nach 10 Minuten einen noch zweifelhaften, erst nach 22 Minuten kräftigen Methämoglobinstreifen.

170 g Temporärer-Extremitätenmuskulatur wird innerhalb  $\frac{1}{2}$  Stunde nach Dekapitation der Frösche durch Zerreiben mit Quarzsand, Mischen mit Kieselgur und Behandlung unter der hydraulischen Presse zu 75 ccm hellgelben, leicht opaleszierenden Preßsaftes verarbeitet.

10 ccm unverdünnter Preßsaft + 0,25 g Dinitrobenzol: nach 1 Stunde keine charakteristische Färbung, nach 15 Stunden kaum mehr.

Probe + Soda: unveränderte Farbe, Diazoreaktion: negativ.

4 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 2 ccm Preßsaftfiltrat: Methämoglobinstreifen nach 10 Minuten —, nach 16 Minuten sehr matt.

4,5 ccm Preßsaft mit 9 ccm Wasser verdünnt + 0,25 g Dinitrobenzol: Keine Reduktion zum Hydroxylamin.

Kontrolle: 4 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm unverdünnter Muskelpreßsaft: Nach 30 Minuten kein Methämoglobinstreifen.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß mit steigender Zerstörung der Zellstruktur eine steigende Beeinträchtigung der Nitroreduktion einhergeht.

Dem entspricht die Beobachtung Thunbergs<sup>1)</sup>, daß kräftige Zerreibung von Muskulatur mit Glaspulver eine sehr bedeutende Verminderung des Gaswechsels verursacht, und weiter, daß, wenn man ganze Froschmuskeln bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . durchfrieren und dann auftauen läßt, ihr Gaswechsel zwar noch vorhanden

<sup>1)</sup> Skand. Arch. Bd. 22, S. 406 (1909). 1. Mitteilung.

ist, aber z. B. ihr Sauerstoffverbrauch auf 15—18% des Normalwertes gesunken ist.

### Narkose.

Ein Wasserfrosch wird wie üblich präpariert. Die Muskulatur des einen Beines (5,2 g) wird in ein Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol und 50 ccm Wasser hineingeschnitzelt, das 1% Äther enthält. Kontrolle ohne Äther mit der gleichen Menge Muskulatur des andern Beines.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 22 Min.	farblos	beginnende Gelbfärbung
„ 1 1/4 Std.	sehr schwach gelb	kräftig gelb

6,5 g Froschmuskulatur der einen Seite in das übliche Gemisch, das 4% Äther enthält; entsprechende Kontrolle.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 30 Min.	farblos	hellgelb
„ 1 1/2 Std.	„	kräftig gelb
„ 5 „	„	„ „

4 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 2 ccm Muskelfiltrat: 5 ccm Kaninchenblut + 1 ccm Filtrat:  
 nach 12 Min. kein Methämogl.-Str. nach 1 Min. matter Methämogl.-Str.  
 „ 2 „ deutlicher „

Wiederholung des Versuches liefert das gleiche Resultat.

2,1 g Froschmuskulatur der einen Seite in ein Gemisch von 30 ccm Wasser, das 16% Äthylalkohol enthält, und 0,3 g Dinitrobenzol. Kontrolle.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 2 1/2 Std.	gelb aber wesentl. heller als Kontrolle	kräftig gelb
„ 16 „	dto.	„ „

Je 5 ccm einer Lösung von gewaschenen Hammelblutkörperchen, die gegenüber der ursprünglichen Blutmenge 1 : 7 verdünnt war, + 0,25 ccm Muskelfiltrat:

nach 2 Min.	?	nach 1 Min.	matter Methäm.-Str.
2,5 "	matter Streifen	1,5 "	matter aber deutl. Str.
3 "	deutlicher Streifen.	2 "	deutlicher Streifen.

7,2 g Eskulentenmuskulatur der einen Extremität in ein Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol und 50 ccm chloroform-gesättigtes Wasser, — die gleiche Menge Muskulatur vom andern Bein in das gleiche Gemisch ohne Chloroform:

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 1 1/2 Std.	farblos	kräftig gelb
" 5 "	"	" "

Narkose lähmt den Reduktionsprozeß also komplett.

Über die ungleichmäßige Narkose der verschiedenen Organismen, der verschiedenen Organe desselben Organismus und der verschiedenen Funktionen derselben Zelle, die als Lähmung enzymatischer Prozesse aufzufassen ist, muß auf die erschöpfende Monographie H. Wintersteins<sup>1)</sup> verwiesen werden; aus ihr geht hervor, daß besonders leicht die fermentativen Oxydationsprozesse narkotisierbar sind.

Schädigende Wirkung von erhöhter Temperatur.

5,5 g Eskulentenmuskulatur werden in 50 ccm destilliertes Wasser von 60° hineingeschnitzelt und 8—10 Minuten bei 55—60° gehalten; dabei trübt sich die Flüssigkeit milchig. Dann wird rasch auf weniger als 25° abgekühlt und mit 0,5 g Dinitrobenzol versetzt.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 5 Std.	völlig farblos	kräftig gelb

<sup>1)</sup> J. Springer, Berlin 1919.

## Schädigende Wirkung von hypertotonischer Salzlösung.

6 g Eskulentenmuskulatur in ein Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol und 50 ccm 5%ige NaCl-Lösung. — Kontrolle mit Wasser.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 22 Min.	farblos	farblos
nach 2 Std.	"	kräftig gelb
nach 5 Std.	minimale Gelbfärbung	kräftig gelb

## Hemmung durch arsenige Säure.

6,2 g Eskulentenmuskulatur in Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol und 50 ccm  $\frac{1}{4}$ %iger neutralisierter  $As_2O_3$ -Lösung.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 3 Std.	hell aber deutlich gelb	kräftig gelb
5 ccm 1:7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm Muskelfiltrat:		wie Hauptversuch:
nach 2 Min. matter Methämogl.-Str.		nach 1 Min. deutl. Methämogl.-Str.
nach 3 Min. deutl. " "		nach 2 Min. kräft. Methämogl.-Str.
Filtratprobe + Soda: kräftig rot.		

5,7 g Eskulentenmuskulatur in Gemisch von 0,5 Dinitrobenzol und 50 ccm 1%ige Kaliumarsenitlösung.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 50 Min.	hellgelb	hellgelb
nach 5 Std.	unverändert hellgelb	kräftig gelb
Probe + Soda:	nur rosafarben	violett

## Lähmung durch Chinin.

5,3 g Eskulentenmuskulatur in Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol und 50 ccm 0,2%iger Lösung von salzsaurem Chinin.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 50 Min. nach 2 Std.	sehr schwach gelb unverändert	gelb kräftig gelb
5 ccm 1:7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm Muskelfiltrat: Nach 20 Minuten kein Methämoglobin-Str.		

## Zusatz von Schwefel.

Zur Prüfung der Frage, ob etwa die Reduktion der Nitrogruppe direkt durch eine Sulfhydrylgruppe hervorgerufen werde, was allerdings im Hinblick auf die Narkotisierbarkeit der Reaktion und ihre Lähmung durch hypertotonische Salzlösung von vornherein unwahrscheinlich war, wurde versucht, die reduzierende (hydrierende) Wirkung der hypothetischen SH-Gruppe von  $\text{NO}_2$  auf zugesetzten Schwefel abzulenken.

7,3 g Eskulentenmuskulatur in Gemisch von 50 ccm Wasser, 0,5 g Dinitrobenzol und 0,08 g gefällten fein gepulverten Schwefel.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 35 Min. nach 1 $\frac{3}{4}$ Std.	hellgelb Beide gleich kräftig gelb, mit Soda gleich stark violett. Kein $\text{H}_2\text{S}$ -Geruch.	hellgelb

Dieses Resultat bestätigt Heffters<sup>1)</sup> Auffassung, daß es sich bei der Reduktion der Nitrate und des Nitrobenzols einerseits, — der Farbstoffe, des Schwefels, der Kakodylsäure usw. andererseits um zwei verschiedene Vorgänge handelt, und man erkennt aus den Arbeiten von Loewe<sup>2)</sup> und Hasse<sup>3)</sup>,

<sup>1)</sup> Med. naturwissensch. Arch. Bd. 1, S. 81 (1908).

<sup>2)</sup> Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Med. 1919, S. 171.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 98, H. 4—6, S. 1 (1919).

daß z. B. die biologische Methylenblau-Reduktion ein definierbarer rein chemischer Prozeß sein kann, hervorgerufen durch alkalische Glykokoll-Lösung, ebenso wie die Reduktion des Schwefels durch Cystein bewirkt werden kann (Heffter).

Als charakteristisch für die rein chemisch verlaufenden Reduktionen bezeichnet Heffter noch ihre Unversehrtheit durch Blausäure<sup>1)</sup>, während die erste Gruppe der Reduktionen durch sie stark gehemmt werde. Auch ein derartiger Versuch mit HCN entsprach bei unserem Beispiel der Erwartung.

#### Wirkung von Blausäure.

8 g Eskulentenmuskulatur in Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol und 50 ccm 0,1‰iger HCN.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 2 1/2 Std.	sehr hellgelb	intensiv gelb
5 ccm 1:7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm Filtrat:		wie Hauptversuch:
nach 9 Min. kein Methämoglobin-Str.		nach 1 Min. matter Methäm.-Str.
4 ccm Blut + 2 ccm Filtrat:		nach 2 „ deutl.
nach 9 Min. kein Methämoglobin-Str.		
nach 15 Std. deutlicher Streifen.		

#### Bedeutung des Atmungskoferments (Meyerhof) für den Reduktionsprozeß.

Vorversuch: 4,2 g Eskulentenmuskulatur werden in 60 ccm destilliertes Wasser hineingeschnitzelt, öfters umgeschüttelt und nach 10 Minuten mit 0,5 g Dinitrobenzol versetzt; die gleiche Menge Muskulatur wird zur Kontrolle direkt in das entsprechende Gemisch hineingeschnitten. Nach 2 1/2 Stunden

<sup>1)</sup> Vgl. Meyerhof: Untersuchungen zur Atmung getöteter Zellen (II.), Pflügers Arch. Bd. 170, S. 378 (1918). „Das Verhalten gegenüber der Blausäure zeigt besonders deutlich, daß wir es mit einem schon weitgehend veränderten Oxydationsvorgange zu tun haben . . . , denn selbst  $\frac{n}{100}$  HCN hemmt nur ganz schwach“.

ist kein Unterschied in der Intensität der Gelbfärbung der beiden Versuche erkennbar.

#### Auswaschung des „Atmungskörpers“<sup>1)</sup>.

6,5 g Eskulentenmuskulatur werden in 400 ccm destillierten Wassers hineingeschnitten, umgerührt, kurz stehen gelassen und über Gaze abfiltriert; dieselbe Operation wird viermal wiederholt (Dauer 15 Minuten); dann wird die extrahierte Muskulatur in 50 ccm Wasser suspendiert und mit 0,5 g Dinitrobenzol vermischt. Kontrolle mit der zerschnittenen Muskulatur der anderen Seite ohne Wassereextraktion.

Zeit	Hauptversuch	Kontrolle
nach 1 1/2 Std.	farblos	beginnende Gelbfärbung
„ 2 „	„	gelb
„ 2 1/2 „	„	stark gelb
„ 7 1/2 „	völlig farblos	„ „

Auswaschung des „Atmungskörpers“ und Wiederaufsetzen im Muskelkochsaft.

9,8 g Eskulentenmuskulatur werden (wie im vorigen Versuch) 5 mal mit je 400 ccm destillierten Wassers extrahiert und abfiltriert, dann feucht in zwei gleiche Hälften geteilt.

Die erste Hälfte wird in das Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol und 50 ccm Wasser eingetragen; die zweite Hälfte in ein Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol, 44 ccm destillierten Wassers und 6 ccm „Muskelkochsaft“, der, nach Meyerhof<sup>2)</sup> bereitet, eine opaleszierende, sonst klare Flüssigkeit darstellt. Drittens wurde eine Kontrolle mit 2,2 g normaler Muskulatur desselben Frosches in 25 ccm Wasser und 0,25 g Dinitrobenzol angesetzt.

<sup>1)</sup> Meyerhof, Über das Vorkommen des Kofersments der alkoholischen Hefegärung im Muskelgewebe und seine mutmaßliche Bedeutung im Atmungsmechanismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 101, S. 165 (1917).  
 — Derselbe, Über das Gärungskoferment im Tierkörper, ebenda Bd. 102, S. 1 (1918).

<sup>2)</sup> loc. cit.

Zeit	Extrah. Musk.	Dasselbe + Kochsaft	Kontrolle
nach 2 Std.	farblos	ganz schwache Gelbfärbung der Muskelstücke	sehr hell gelb
15 "	"	gelb, aber heller als Kontrolle	mäßig kräftig gelb

Wiederholung des Versuches mit 12 g Muskulatur:

erste Hälfte + 0,5 g Dinitrobenzol + 50 ccm Wasser

zweite " + 0,5 g " + 50 ccm " + 6 ccm Kochsaft.

Kontrolle: 5 g Muskulatur + 0,5 g Dinitrobenzol + 50 ccm Wasser.

Zeit	Extrah. Musk.	Dasselbe + Kochsaft	Kontrolle
nach 40 Min.	farblos	farblos	sehr hell gelb
1 1/4 Std.	"	beginnende Gelbfärbung	hellgelb
2 "	"	sehr hell aber deutl. gelb	gelb
24 "	"	" " " "	"
Sodazusatz	"	rosa	violett

Auswaschung des „Atmungskörpers“ und Wiederaufhängen im „Hefekochsaft“<sup>1)</sup>.

Vorversuch: 10 ccm Trockenhefemacerationssaft (Lebedew)<sup>2)</sup> werden 50 Sekunden in 95°igem Wasser koaguliert und filtriert. 5 ccm Filtrat werden mit 0,7 ccm n-Natronlauge neutralisiert, mit 4,3 ccm Wasser verdünnt und mit 0,3 g Dinitrobenzol versetzt. Es tritt keine Reduktion ein: 1 ccm Filtrat + 5 ccm 1:7 verdünntes Kaninchenblut:

nach 10 Minuten kein Methämoglobinstreifen

Diazoreaktion: —

mit Soda keine Rotfärbung.

<sup>1)</sup> Meyerhof, Pflüg. Arch. Bd. 170, S. 367 und 428 (1918). Derselbe ebenda Bd. 175, S. 20 (1919).

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 447 (1911).

**Hauptversuch:** 12 g Eskulentenmuskulatur werden, wie beschrieben, 5mal mit destilliertem Wasser extrahiert und abfiltriert:

erste Hälfte + 30 ccm Wasser + 0,5 g Dinitrobenzol

zweite Hälfte + 30 ccm Wasser + 0,5 g Dinitrobenzol + 4,5 ccm Hefekochsaft, der aus 10 ccm Macerationssaft gewonnen und mit 0,6 ccm n-Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisiert war.

**Kontrolle:** 5 g normale Muskulatur vom gleichen Frosch in das entsprechende Gemisch ohne Hefekochsaft.

Zeit	Extrah. Musk.	Dasselbe + Hefekochsaft	Kontrolle
nach 10 Min.	farblos	hellgelb	—
„ 50 Min.	„	schmutzig-gelb (+ Soda: hellviolett)	hellgelb
„ 1 $\frac{1}{4}$ Std.	-	rotgelb (+ Soda: violett)	gelb
„ 4 $\frac{3}{4}$ -	-	kräftig rot, mit n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> gegen Lackmus neutralisiert: dunkelgelb (+ Soda: prächtig violett).	kräftig gelb aber heller als der Hauptversuch mit Hefekochsaft.

Je 5 ccm 1:7 verdünntes Kaninchenblut + je 1 ccm Muskelfiltrat:

Methämoglobinstreifen nach	1/2 Min	—	3/4 Min.	—
-	1	„ matt	1 1/2	„ matt
-	1 1/2	„ deutl.	3	„ matt aber deutl.
-	3 1/2	„ kräftig		

Vollständig parallel zu diesen Resultaten gingen die von Meyerhof (loc. cit.), der fand, daß die Atmung grob zerkleinerter Froschmuskulatur durch mehrfaches Ausziehen mit großen Mengen Wassers vollständig erlischt und durch Zugabe von Muskelkochsaft und ebenso von Hefekochsaft wieder hervorgerufen wird. Meyerhof bemerkt dazu: „Die Resultate stützen die schon recht alte Hypothese, daß die ersten

Phasen der Atmung und Gärung nahe verwandt sind. Die Überführung des Zuckers in eine 3 C-Verbindung, die dann vergoren oder oxydiert werden könnte, mag im Falle der Atmung oder Gärung ein ähnlicher Vorgang sein . . .

Für die Verwandtschaft zwischen der Atmung der extrahierten Muskulatur und des gewaschenen Heferückstandes spricht endlich der Umstand, daß es bei beiden gelingt, durch hexosephosphorsaures Natron einen der natürlichen Atmung außerordentlich ähnlichen Oxydationsprozeß zu erregen. Dieser Befund hat für den Muskel ein besonderes Interesse durch die Feststellung Embdens und Laquers, daß Hexosephosphorsäure die Vorstufe der im Muskel gebildeten Milchsäure ist.“

Abhängigkeit des Reduktionsumfanges nicht nur von der absoluten Muskelmenge, sondern auch von der Konzentration

Von einem großen Wasserfrosch werden 6, 4, 2 g Muskulatur je in ein Gemisch von 50 ccm Wasser und 0,5 g Dinitrobenzol hineingeschnitten.

	6 g	4 g	2 g
nach 1 Std.	hell gelb	sehr hell gelb	fast farblos
„ 2 $\frac{1}{2}$ „	kräftig gelb	mäßig gelb	sehr hell gelb
„ 5 $\frac{1}{2}$ „	„ „	„ „	„ „

Je 4 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 2 ccm Muskelfiltrat

Methämogl.-Str.	6 g	4 g	2 g
nach $\frac{3}{4}$ Min.	deutlich	—	—
„ 1 „	„	—	—
„ 2 „	„	sehr matt	—
„ 2 $\frac{1}{2}$ „	„	matt aber deutl.	—
„ 35 „	„	—	—
„ 14 Std.	„	—	sehr deutlich

Man erkennt, daß die Methämoglobinbildung nicht um das  $1\frac{1}{2}$  fache, resp. das Doppelte verzögert ist, wie es der Verdünnung entspräche, sondern um das Dreifache, resp. Vielfache.

Dem entspricht, daß „die Atmungsgröße von der Konzentration des wasserlöslichen Atmungskörpers abhängt . . . , daß also schon in unbehandelter Hefe die Oxydationsgeschwindigkeit mit wachsender Verdünnung zurückgeht“ (Meyerhof<sup>1)</sup>).

Einfluß maximaler Ermüdung des Muskels auf die Reduktion.

Sämtliche Muskeln des einen Beines eines Wasserfrosches werden vorsichtig frei präpariert und einzeln aber gemeinsam an Reizelektroden in der oben beschriebenen Weise befestigt und in Ringerlösung mit Sauerstoff umspült. Alle 5 Sekunden werden sie durch einen Induktionsschlag von sich allmählich steigender Stärke zur Kontraktion gebracht; nach 1 Stunde sind die Zuckungen minimal, nach  $1\frac{1}{4}$  Stunden werden die Muskeln in ein Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol und 50 ccm Wasser hineingeschnitzelt. Als Kontrolle wird die Muskulatur des anderen Beines die gleiche Zeit in Ringerlösung aufbewahrt und in das gleiche Reaktionsgemisch eingetragen.

	Hauptversuch	Kontrolle
nach 2 Std.	sehr blaßgelb	kräftig gelb

Wiederholung des Versuches in gleicher Weise:

nach $\frac{1}{2}$ Std.	farblos	beginnende Gelbfärbung
„ $1\frac{1}{4}$ „	beginnende Gelbfärbung	gelb
„ 4 „	hellgelb	kräftig gelb

Wiederholung der Versuche, jedoch mit dem Unterschied, daß das Reaktionsgemisch des Hauptversuchs aus 0,5 g Dinitro-

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. Bd. 170, S. 382 (1918).

benzol und 50 ccm 1%iger Kaliumbicarbonatlösung besteht. Kontrolle wie oben.

	Hauptversuch	Kontrolle
nach 35 Min.	hellgelb	beginnende Gelbfärbung
„ 1 $\frac{1}{2}$ Std.	kräftig gelb mit rotem Stich	kräftig gelb
„ 4 „	ebenso	„
	mit n-Schwefelsäure ver- setzt, bis nicht mehr alkalisch; dann ist die Farbe ein kräftiges rei- nes Gelb	
	Probe + Soda: violett	Probe + Soda: rotviolett

Je 5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm Muskelfiltrat:

Methämogl.-Str.	Hauptversuch	Kontrolle
nach $\frac{1}{2}$ Min.		
„ $\frac{3}{4}$ -	matt aber deutlich	matt aber deutlich
„ 1 $\frac{1}{2}$ -	ganz deutlich	ganz deutlich

Aus den Versuchen geht hervor, daß die Reduktionshemmung durch vorangegangene maximale Ermüdung auf die Steigerung der [H $\cdot$ ]-Konzentration infolge Anhäufung von Milchsäure zu beziehen und durch Neutralisation zu beseitigen ist.

Parallel damit stellte Thunberg<sup>1)</sup> Hemmung der Gewebsatmung durch H-Ionen fest, Meyerhof<sup>2)</sup> als Atmungsoptimum den Neutralpunkt bzw. ganz schwache Alkalität.

Ferner zeigt sich, daß der Reduktionsvorgang des Nitrokörpers nicht an die Phase der Muskelkontraktion geknüpft ist; dem entspricht, daß Hill<sup>3)</sup> die Wärmeproduktion, Verzář<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Skand. Arch. Bd. 23, S. 154 (1910).

<sup>2)</sup> Pfügers Arch. Bd. 175, S. 32 (1919).

<sup>3)</sup> Ergebn. d. Physiol. Bd. 15, S. 340 (1916)

<sup>4)</sup> Ebenda Bd. 15, S. 1 (1916).

den Sauerstoffverbrauch als hauptsächlich der Phase der Muskelrestitution angehörig nachwies.

Reduktionswirkung der Muskulatur unter anaeroben Verhältnissen.

50 ccm destilliertes Wasser werden ausgekocht und in einer Atmosphäre von reinem Stickstoff erkalten gelassen, dann werden im Stickstoffstrom 5 g frische Eskulentenmuskeln hineingeschnitzelt und  $\frac{3}{4}$  Stunden darin unter öfterem Umschütteln gelassen. Schließlich werden 0,5 g Dinitrobenzol hinzugefügt und — dauernd im  $N_2$ -Strom — mehrfach umgeschüttelt. Kontrolle mit  $\frac{3}{4}$  Stunden zerschnitten in Wasser aufbewahrter, dann mit Dinitrobenzol versetzter Muskulatur.

	Hauptversuch	Kontrolle
nach 15 Min.	deutlich hellgelb	farblos
„ 35 „	deutlich gelb	„
„ 1 Std.	kräftig zitronengelb	deutlich hellgelb
„ 1 $\frac{1}{4}$ „	kräftig gelb	hellgelb
„ 3 $\frac{1}{4}$ „	„ „	kräftig gelb, aber heller als Hauptversuch
Probe + Soda:	rotviolett	rotviolett

Je 5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm Muskelfiltrat:

Methämogl.-Str. nach $\frac{1}{2}$ Min. matt, deutlich,	nach 1 Min. matt,
„ „ „ 1 $\frac{1}{2}$ „ völlig deutlich.	„ 1 $\frac{3}{4}$ „ deutlich,
	„ 2 $\frac{1}{4}$ „ völlig deutl.

Zwei Versuche mit Durchleitung von Wasserstoff verliefen entsprechend. Dinitrobenzol dient also bei Abwesenheit von atmosphärischem Sauerstoff als Wasserstoffakzeptor für die Atmung. Damit ist zu vergleichen<sup>1)</sup>: „Die  $CO_2$ -Abgabe des überlebenden Muskels nimmt zu in Gegenwart von genügend Sauerstoff, fehlt dagegen unter anaeroben Umständen . . . Die Versuche

<sup>1)</sup> Verzář loc. cit. S. 38.

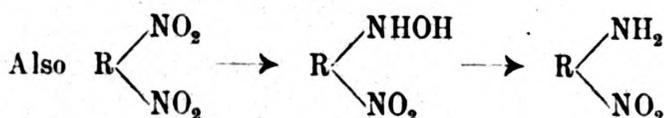
bei vollständiger Anoxybiose zeigen die Unwahrscheinlichkeit, daß im Muskel ein von der Sauerstoffaufnahme unabhängiger und bis zur Kohlensäurebildung ablaufender Zerfallprozeß möglich ist.“

## 8. Übertragung der Reaktion auf andere Zellen und Zellgruppen.

### Bäckerhefe.

5,5 g frische Bäckerhefe wird in ein Gemisch von 0,5 g Dinitrobenzol und 50 ccm destilliertes Wasser sorgfältig eingerührt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Bereits nach 15 Minuten hat sich das Gemisch kräftig gelb gefärbt, nach 45 Minuten gibt eine Filtratprobe mit Soda eine intensiv violette Farbe. 1 ccm Filtrat + 5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut zeigt nach  $\frac{1}{2}$  Minute einen matten, nach  $1\frac{1}{2}$  Minuten einen deutlichen Methämoglobinstreifen. Diazo-reaktion mit  $\alpha$ -Naphthol: negativ.

Nach 16 Stunden weiteren Stehens jedoch fällt die Diazo-reaktion kräftig positiv aus, die Griebßsche Reaktion negativ.



### Trockenhefe nach Lebedew.

4 g Hefe, 0,5 g Dinitrobenzol, 50 ccm Wasser: nach 12 Minuten beginnt Gelbfärbung, die nach 1 Stunde kräftig ist und mit Soda in Violett umschlägt.

### Trockenhefe-Macerationssaft nach Lebedew.

5 ccm Macerationssaft (entsprechend 5 g Hefe) werden mit 0,75 ccm n-Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisiert, dann mit 4,25 ccm Wasser und mit 0,3 g Dinitrobenzol gemischt.

Nach 15 Minuten bereits kräftige Rotfärbung, die durch Zusatz von 2 Tropfen n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Gelb umschlägt. Nach 3 Stunden gibt eine Filtratprobe mit NH<sub>3</sub> eine violette Färbung.

5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm Filtrat:

Methämoglobinstreifen nach 1 Min.	--
" " 2 1/2 "	matt,
" " 4 "	deutlich

Mit diesem Versuch ist Selbstgärung der Hefe als Ursache der Reduktionswirkung ausgeschlossen und ihre Atmung als Ursache festgestellt<sup>1)</sup>.

#### Pflanzenkeimlinge.

Rübsamen werden auf feucht gehaltenem Filtrierpapier rasch zum Keimen gebracht, 1 g der jungen Keimlinge wird mit 10 ccm destilliertem Wasser und 0,3 g gepulvertem Dinitrobenzol vermischt. Bereits nach  $\frac{3}{4}$  Stunden ist das anfangs farblose Gemisch zitronengelb geworden, und zwar haben sich die Keimlinge selbst wieder am intensivsten gefärbt; nach  $1\frac{1}{2}$  Stunden kräftig gelbe Lösung, nach 4 Stunden wird abfiltriert: das intensiv gelbe Filtrat gibt mit Soda eine violettrote Färbung, mit  $\alpha$ -Naphthol in sodaalkalischer Lösung gekuppelt, eine kräftige Diazoreaktion.

1 ccm Filtrat + 5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut zeigt bereits nach  $\frac{1}{4}$  Minute beginnenden Methämoglobinstreifen, nach  $\frac{1}{2}$  Minute einen deutlichen, nach 1 Minute einen kräftigen.

Also sehr energische Reduktionswirkung unter Bildung von Hydroxylamin und Amin!

#### Organe von Kaninchen.

Ein kleines Kaninchen (625 g) wird durch Entbluten getötet; die Organe werden noch möglichst warm herausgenommen, in ein Gemisch von je 0,5 g Dinitrobenzol und 30 ccm körperwarmer Ringerlösung hineingeschnitzelt und  $3\frac{1}{2}$  bis 4 Stunden im Brutschrank aufbewahrt, wobei rasch Gelbfärbung eintritt.

<sup>1)</sup> Vgl. Meyerhof loc. cit.

	3,5 g Lunge	5,1 g Niere	4,7 g Leber	4,9 g Magen- schleimhautfalten
nach 4 Std. Filtrat Probe + Soda	gelbbräunl. purpurrot	leuchtend gelb tief violett	kräftig gelb violett	zitronengelb kirschrot

(Färbung verblaßt allmählich)

5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm Filtrat:

Methäm.-Str. nach 0,2 Min. 1	ganz deutlich kräftig	0,2 Min. dunkel schwarz	0,3 Min. deutl. dunkel	0,4 Min. matt ganz deutlich
------------------------------------	--------------------------	----------------------------	---------------------------	--------------------------------

Sämtliche untersuchten Organe bilden durch Reduktion m-Nitrophenylhydroxylamin.

### 9. Reduktion anderer Nitrokörper durch Gewebe.

Versuche, Anilin durch zerschnittene Froschmuskeln, Froschleber, Kaninchenleber oxydativ zu verändern, verliefen negativ, ebenso vielfache Versuche, Nitrobenzol, Trinitrotoluol und m-Nitranilin durch Froschmuskulatur zu reduzieren.

Hingegen läßt sich o-Dinitrobenzol durch Gewebe in gleich charakteristischer Weise reduzieren wie die p-Verbindung: 4,3 g Eskulentenmuskulatur werden in ein Gemisch von 0,5 g o-Dinitrobenzol und 30 ccm destillierten Wassers hineingeschnitzelt; nach 20 Minuten ist beginnende Gelbfärbung erkennbar, die rasch zunimmt. Nach wenigen Stunden wird filtriert. Die kräftig gelbe Flüssigkeit gibt mit Soda eine tiefblau-violette unbeständige Färbung.

5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm Filtrat:

Methämoglobinstreifen nach  $\frac{1}{2}$  Minute ganz deutlich  
" " 1 " sehr kräftig.

2,4-Dinitrotoluol-1. 4 g Eskulentenmuskulatur werden in der üblichen Weise in ein Gemisch von 0,5 g fein gepulvertem Dinitrotoluol und 30 ccm Wasser hineingeschnitzelt. Das zunächst farblose Gemisch beginnt nach  $\frac{1}{2}$  Stunde sich hellgelb zu färben und ist nach  $2\frac{3}{4}$  Stunden ziemlich kräftig

gelb. Filtratprobe + Soda: Rotviolette allmählich verblässende Farbe.

5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm Filtrat:

Methämoglobinstreifen nach 1 Minute matt,  
" " 2 " deutlich.

Kontrolle: 1 ccm einer 1%igen Dinitrotoluollösung in 60% Alkohol zeigt mit Blut auch nach 1 Stunde keinen Methämoglobinstreifen.

Wiederholung des Versuches mit 8 g Muskulatur ergibt nach 4 Stunden ein zitronengelbes Filtrat, das sich auf Sodazusatz hellviolett färbt.

1 ccm Filtrat + 5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut zeigt nach 3 Minuten einen sehr matten, nach 4 1/2 Minuten deutlichen Methämoglobinstreifen.

Symmetrisches Trinitrobenzol. 9,5 g Eskulentenmuskulatur werden in ein Gemisch von 0,5 g Trinitrobenzol und 30 ccm Wasser hineingeschnitzelt. Die Flüssigkeit bleibt wenig gefärbt. Nach 7 Stunden: Filtratprobe + Soda gelbrot.

5 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 1 ccm Filtrat:

nach 1 Stunde sehr matter Methämoglobinstreifen,  
" 2 " matt aber deutlich.

Wiederholung des Versuches mit 6 g Muskulatur ergibt eine Hellgelbfärbung, die auf Sodazusatz gelbrot wird.

4 ccm 1 : 7 verdünntes Kaninchenblut + 2 ccm Filtrat:

Methämoglobinstreifen nach 3 Minuten sehr matt,  
" 4 " matt aber deutlich.

## 10. Toxikologische Versuche mit m-Nitrophenylhydroxylamin.

Einem Grasfrosch von 30 g Gewicht werden 10 mg der Substanz in das aufgesperrte Maul geschüttet, unmittelbar darauf kneift er die Augen zu und springt wild umher.

Nach 15 Minuten: Mitunter sistiert die Atmung.

" 25 " Das Tier liegt mit vorgeneigtem Kopf schlaff da und atmet schwach und unregelmäßig; die Rückenlage wird bereits

ertragen. — Nun wird das Herz freigelegt: das Blut in ihm ist auffallend hell, schmutzig rot. Die Herzaktion ist schwach, die Diastole verlängert, die Systole unvollständig.

- Nach 38 Minuten: Auch die Diastole ist unvollständig, die Systole krampfhaft. Blut: graurot.  
 „ 41 „ Herzstillstand.

Ein Grasfrosch von 17 g Gewicht bekommt 1 mg in 1 ccm Wasser emulgiert in den Brustlymphsack.

Nach 12 Minuten: Atmung unregelmäßig, mitunter aussetzend.

„ 17 „ Das Tier sperrt krampfhaft das Maul auf, läßt den Kopf hängen, erträgt die Rückenlage und zeigt sehr schwache Reflexe.

„ 20—40 „ Zunehmende Schläffheit; schließlich liegt das Tier bewegungslos da.

Nach 50 Minuten: Herz freigelegt; Blut grau; schwaches Schlagen des Vorhofes.

„ 52 „ Diastolischer Stillstand.

Ein Kaninchen von 900 g bekommt 5 mg der Substanz subcutan, in 2 ccm 50% igem Alkohol gelöst.

Nach 4 Minuten: Atmung beschleunigt, stoßweise, Zittern der Gesichtsmuskeln.

„ 15 „ Dyspnoe.

„ 20 „ Blut aus der Ohrvene enthält kein Methämoglobin.

„ 25 „ Sehr frequentes flaches Atmen.

„ 35 „ Starke Dyspnoe, Tier legt sich hin.

„ 43 „ Tier sitzt wieder, stark dyspnoisch mit weit aufgerissenen Augen.

„ 50 „ Atmung noch forciert.

Tier erholt sich.

Das gleiche Tier bekommt 2 Tage später 10 mg der Substanz subkutan.

Nach 2 Minuten:	Leichte Unruhe und verstärkte Atmung.
„ 7 „	Forcierte Atmung, Zittern der Backenmuskulatur.
„ 11 „	Atmung äußerst flach und frequent.
„ 22 „	Tier liegt, ist stark dyspnoisch.
„ 29 „	Tier liegt ganz flach mit keuchender Atmung.
„ 35 „	Blut aus der Ohrvene ist schwerflüssig und dunkelbraunrot, zeigt deutlichen, aber matten Methämoglobinstreifen, mikroskopisch Anisocytose und einzelne Heinzsche Körperchen.
„ 60 „	Status des Tieres unverändert, Reflexe normal.
„ 75 „	Leichte Besserung.
„ 120 „	Noch leicht dyspnoisch.

Tier erholt sich. Entleerung von 2 ccm dunkeln alkalischen Harnes, Probe angesäuert + Natriumnitrit: kein Bismarckbraun; Probe mit  $\alpha$ -Naphthol gekuppelt: starke Diazoreaktion; Probe + Ammoniak: gelb.

Am nächsten Tag enthält das Blut 4,5 Millionen Erythrocyten, 16800 Leukocyten, einzelne Heinzsche Körperchen; starke Polychromatophilie und Anisocytose.<sup>1)</sup>

Am 7. und 8. Tag bekommt das Kaninchen wieder 10 mg der Substanz subkutan, wobei die gleichen Vergiftungssymptome — jedoch abgeschwächt — auftreten; darauf entnommenes Blut zeigt starke Polychromatophilie und massenhaft Heinzsche Körperchen; es ist bräunlich gefärbt, ohne erkennbare Mengen von Methämoglobin zu enthalten.

Ein Kaninchen von 1270 g mit normalem Blutbild und einem Hämoglobingehalt von 63% bekommt 5 mg Nitrophenylhydroxylamin in 3 ccm 30%igen Alkohols gelöst intravenös.

<sup>1)</sup> Für seine freundliche Unterstützung bei Fixierung der Blutbefunde bin ich Herrn Privatdozent Dr. S. Isaac zu herzlichem Dank verpflichtet.

- Nach 2 Minuten: Starke Dyspnoe.
- „ 4 „ Blut aus der Ohrvene braun, zeigt deutlichen Methämoglobinstreifen, Hb-Gehalt 61%, Blutbild normal.
- Nach 8 Minuten: Tier zittert und ist äußerst dyspnoisch; schließlich liegt es matt mit dem Kopf auf dem Boden.
- „ 17 „ Zustand weniger bedrohlich, Kollern im Darm, von Zeit zu Zeit krampfartiges Zittern des ganzen Körpers.
- „ 27 „ Blut braunrot, Hb-Gehalt 61%, mikroskopisch einzelne Heinzsche Körperchen, deutlicher Methämoglobinstreifen.
- „ 30–60 „ Tier erholt sich allmählich.

Ein graues Kaninchen bekommt in das rechte Auge 1 Tropfen einer 1‰igen ätherischen Nitrophenylhydroxylaminlösung, in das linke Auge zur Kontrolle 1 Tropfen Äther. Am Kontrollauge ist nach 5 Minuten eine ganz leichte Rötung der Conjunctiva zu erkennen, die aber rasch vorübergeht; nach 15 Minuten ist das Auge völlig frei von Reizerscheinungen und bleibt so. — Das rechte Auge dagegen wird dauernd zugekniffen und ist sehr lichtscheu; nach 15 Minuten trânt es sehr stark, es entwickelt sich starke Chemosis. Noch nach 24 Stunden ist die Schleimhaut stark gerötet; geringe Eiterung.

Wie also schon im allgemeinen Teil der Arbeit angegeben war, besteht die Giftwirkung der Hydroxylaminverbindung in einer starken Veränderung des Blutes sowohl was den Farbstoff betrifft, als auch das morphologische Bild. Die Folge davon ist eine Dyspnoe des Tieres. — Die Ausscheidung des Körpers erfolgt — nach den Reaktionen des Harnes — als Nitranilin. Giftwirkung wie Ausscheidungsart entspricht der des m-Dinitrobenzols, abgesehen von der lokalen Reizwirkung, die dem Nitrophenylhydroxylamin in ausgesprochenem Maße

allein zukommt, und die am Beispiel des  $\beta$ -Phenylhydroxylamin bereits L. Lewin<sup>1)</sup> demonstriert hat.

Überblickt man die Hauptlinien des bisher verfolgten Stoffwechselforganges noch einmal, so ergibt sich: die lebenden Zellen entziehen, indem sie atmen, zugeführten Nitroverbindungen den Sauerstoff und reduzieren sie unter Aufwand von Energie zu Hydroxylaminverbindungen; diese nun sind im Gegensatz zu den ursprünglichen Substanzen schwerste Blutgifte, sie wandeln das Hämoglobin in Methämoglobin um, unterbinden also die Zufuhr des für die Zellatmung notwendigen Sauerstoffes.

So tritt dem vielgenannten „klassischen chemischen Entgiftungsvorgang“ — so bezeichnet noch im Jahre 1914 E. Sieburg<sup>2)</sup> die Ausscheidung des Cupferrons (Ammonsalz des Nitrosophenylhydroxylamins) als p-Aminophenolglukuronsäurelaktam — ein ebenso bizarrer selbstmörderischer Giftungsvorgang entgegen, für den jeder Versuch einer teleologischen Deutung aussichtslos wäre.

Die biologischen Vorgänge sind eben voraussetzungslos; sie sind zwangsläufig zum Teil wider die biologische Nützlichkeit, ja häufig sogar wider die energetische Spontaneität (Exothermie). Sie sind nur als Resultanten einer Unzahl von gleichzeitig verlaufenden chemischen und physiko-chemischen Zellprozessen zu verstehen, die teils gleichgültig nebeneinander verlaufen, teils sich bedingen oder fördern, teils gegeneinander gerichtet sind oder miteinander rivalisieren.

Dieser Komplexität der Zellvorgänge entspricht die vorläufig nur sehr selten vorauszusehende oder zu erklärende Reaktion der Organfunktionen, die mitunter an verschiedenen Tieren auf gleiche Eingriffe sogar entgegengesetzt erfolgt

<sup>1)</sup> loc. cit.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 18 (1914). — Vgl. ebenso z. B. S. Fränkel: „Die Bildung des Glykosids bei der Paarung im Organismus hat den Zweck, den Paarling schwer diosmierbar zu machen“ (Arzneimittelsynthese, 4. Aufl. 1919, S. 177).

(Kaninchen- und Meerschweinchenuterus bei Sympathicusreizung u. a. m.).

Die schon so häufig für Erklärungsversuche gebrauchte Formel „chemische Konstitution und physiologische Wirkung“ reicht bisher nur für die wenigsten Erscheinungen völlig aus, und nicht viel anders ist es mit der „physikalischen Theorie der Arzneimittel- und Giftwirkung“<sup>1)</sup>.

Die Beobachtung Nefs, daß bei geringer Erhöhung der OH-Ionenkonzentration einer Traubenzuckerlösung mehr als 100 Umwandlungsprodukte des Kohlenhydrates entstehen, zeigt, vor welchen noch nicht abzuschätzenden Schwierigkeiten die biologische Forschung steht, — dreifach schwierig, wenn man bedenkt, daß sich mit dieser materiellen Komplexität eine noch viel größere energetische verbindet (Materie  $\pm$  freie Energie  $\pm$  Wärme), und daß in dieses Chaos von Beziehungen die Begriffsverwandtschaft: „Reaktionsgeschwindigkeit“, „Wirkung des Reaktionsmediums“, „Katalysatorenwirkung“ und „Reaktionskoppelung“ das Element der Zeit hineinbringt.

Von dem Stande solcher Forschungen bleibt die Erkenntnis der Heil- und Giftwirkungen in völliger Abhängigkeit und weiter Entfernung, — und in noch viel weiterer Entfernung die klinische Nutzbarmachung gegenüber Krankheiten.

---

<sup>1)</sup> J. Traube, Biochem. Zeitschr. Bd. 98, S. 177 (1919).

# HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

## PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

E. ABDERHALDEN-Halle, SVANTE ARRHENIUS-Stockholm, G. v. BUNGE-Basel, A. ELLINGER-Frankfurt a. M., G. EMBDEN-Frankfurt a. M., H. EULER-Stockholm, H. FISCHER-Wien, R. GOTTLIEB-Heidelberg, W. v. GULEWITSCH-Moskau, O. HAMMARSTEN-Upsala, S. G. HEDIN-Upsala, V. HENRIQUES-Kopenhagen, G. HOPPE-SEYLER-Kiel, O. KESTNER-Hamburg, F. KNOOP-Freiburg i. Br., L. KREHL-Heidelberg, WM. KÜSTER-Stuttgart, CARL TH. MÖRNER-Upsala, F. v. MÜLLER-München, J. P. PAWLOW-St. Petersburg, C. A. PEKELHARING-Utrecht, F. PREGL-Graz, W. E. RINGER-Utrecht, E. SALKOWSKI-Berlin, S. P. L. SÖRENSEN-Kopenhagen, H. STEUDEL-Berlin, H. THIERFELDER-Tabingen, H. WIELAND-München, R. WILLSTATTER-München, A. WINDAUS-Göttingen, E. WINTERSTEIN-Zürich, R. v. ZEYNEK-Prag

herausgegeben von

**A. KOSSEL,**

Professor der Physiologie in Heidelberg.

---

**Einhundertundneunter Band:**

**Sechstes Heft.**

**Mit 1 Tafel.**

---

(Schluß des Bandes.)  
(Ausgegeben am 15. April 1920.)

---

**BERLIN und LEIPZIG 1920**

**VEREINIGUNG WISSENSCHAFTLICHER VERLEGER**

**WALTER DE GRUYTER & Co.**

vormals G. J. Göschen'sche Verlagshandlung — J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung — Georg Reimer — Karl J. Trübner — Veit & Comp.

**EINHUNDERTUNDNEUNTER BAND  
SECHSTES HEFT.**

<b>Inhalt.</b>	<b>Seite</b>
<b>Ellinger, A. und Z. Matsuoka.</b> Zur Frage der Entstehung von Kynurensäure aus Tryptophan im Tierkörper . . . . .	259
<b>Wrede, Fritz.</b> Zur quantitativen Bestimmung des Selens . . . . .	272
<b>Salkowski, E.</b> Zur Kenntnis der Eiweißbildung aus Harnstoff bei Wiederkäuern . . . . .	276
<b>Gesler, Hans.</b> Zur Frage des Wesens der Stickstoffretention bei Fütterung mit Ammoniaksalzen . . . . .	279
<b>Abderhalden, Emil und Arthur Weil.</b> Versuche über das Wesen der Anaphylaxie. Mit 1 Tafel . . . . .	289

---

Für die nächsten Hefte sind Arbeiten eingegangen von:

A. Mahnert, D. G. Cohen-Tervaert, W. Küster, J. Lifschütz.

---

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie erscheint in Bänden von 6 Heften. Preis des Bandes 25 Mark.

Kurze Notizen oder Bemerkungen zu anderen Arbeiten werden in der Regel am Schluß des Heftes und außerhalb der Reihenfolge des Eingangsdatum mitgeteilt. — Bereits in anderen Zeitschriften veröffentlichte Arbeiten, sowie Referate über bereits publizierte Arbeiten werden nicht aufgenommen.

Das Honorar beträgt für den Druckbogen 40 Mark. Von jeder Arbeit werden dem Verfasser 75 Separat-Abdrücke gratis geliefert.

In bezug auf die Rechtschreibung der Fachausdrücke sind bis auf weiteres die Publikationen der Deutschen chemischen Gesellschaft maßgebend. In zweifelhaften Fällen wird der etymologische und internationale Standpunkt vor dem phonetischen bevorzugt.

---