Zur Pharmakologie der Zellatmung.
II. Mitteilung.
Die Rolle des Eisens bei der Zellatmung.

Von
Ph. Ellinger und M. Landsberger.
Mit 5 Kurven im Text.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 23. August 1922.)

I.

Durch Einführung des Kohlesuspensionsmodells hat Warburg¹⁾ die Untersuchungsmethodik des Zellatmungsmechanismus in neue Bahnen gelenkt. Er macht es durch Analogieschlüsse wahrscheinlich, daß es sich beim Atemvorgang um einen Verbrennungsprozeß von Stoffen handelt, die sich thermodynamisch dem Luftsauerstoff gegenüber in „falschem Gleichgewicht“ befinden, ein Zustand, der mit Hilfe der katalytischen Eigenschaften des „Brennortes“, der Zellstruktur, überwunden wird. Er kann am Kohlemodell diese katalytischen Eigenschaften näher zergliedern und findet nebeneinander, und zwar durch verschiedene Eingriffe getrennt beeinflussbar, einen Adsorptionsprozeß an den großen Oberflächen der Kohle und eine eigentliche Katalyse im engeren Sinne an den in die Kohle eingesprengten Schwermetallatomen. Während der durch Narkotica hemmbare Adsorptionsmechanismus den Gesetzen der Capillarchemie folgt und verhältnismäßig durchsichtig ist, können wir

¹⁾ O. Warburg u. Negelein, Biochem. Zs. Bd. 113, S. 257 (1921); O. Warburg, ebenda, Bd. 119, S. 134 (1921).

uns physiko-chemisch von dem Katalysationsvorgang am Schwermetall noch keine rechte Vorstellung machen. Die einzigen Tatsachen, die Warburg anführt, sind die Cyankaliumhemmung der Katalyse und die Feststellung, daß das Schwermetall nicht durch die Menge, in der es vorhanden ist, wirkt, sondern daß für seine katalytische Wirkung eine ganz besondere Art der Bindung im Brennpunkt vorliegen muß, die Warburg bei der Kohle durch Glühen erzielen konnte.

Durch Einführung der Zelltrümmer hat Ellinger¹⁾ die Analyse der Zellstruktur und der an ihr ablaufenden Vorgänge einen Schritt weiter geführt. Aus Vogelblutzellen schafft er durch räumliche Trennung von Brennpunkt und Brennmaterial in den „Zelltrümmern“ ein Modell, das den tatsächlich in der Zelle vorliegenden Verhältnissen viel näher kommt als die Tierkohlesuspension. Über die Beeinflussbarkeit der Atmung durch quellende und entquellende Substanzen, die an den Adsorptionsflächen angreifen, hat es bereits Fragen beantwortet, auf die uns das Tierkohlemodell eine Antwort schuldig geblieben ist. Wir wollen in der vorliegenden Arbeit an Hand der uns zur Verfügung stehenden Modelle untersuchen, welche Prozesse bei der Schwermetallkatalyse vor sich gehen und wie sie physiko-chemisch zu verstehen sind.

Den Ausgangspunkt für unseren Gedankengang bildeten Warburgs Feststellungen über die Form der Schwermetallbindung, die die Voraussetzung für seine katalytische Wirkung darstellte. Wir suchten nach bekannten physikalischen Prozessen, bei denen Schwermetallatome in einem ähnlichen Zustand gleichfalls die Vorbedingung für das Zustandekommen des betreffenden Vorgangs sind. Ein solcher findet sich in den von Lenard und seiner Schule in zahlreichen Arbeiten aufgeklärten Leuchterscheinungen bei der Rückkehr eines aus seinem Elektronenverband gelösten Elektrons in seine Ruhelage. Am besten bekannt sind von diesen Leuchterscheinungen die Vorgänge bei der Phosphoreszenz. Unter Phosphoreszenz versteht man die Eigenschaft einer Substanz, absorbierte Licht-

¹⁾ Ph. Ellinger, Diese Zs. Bd. 119, S. 11 (1922).

energie in Form von Licht wieder zu emittieren, und zwar noch zu einer Zeit, wo die Absorption nicht mehr stattfindet. Das emittierte Licht ist stets langwelliger als das absorbierte. Von der Phosphoreszenz unterscheidet sich die Fluoreszenz dadurch, daß sie gleichzeitig mit der Absorption, d. h. mit der Bestrahlung, aufhört. Unter Licht muß man Licht im weitesten Sinne, d. h. Ätherwellen jeglicher Länge, verstehen, vom Ultrarot bis zu den γ -Strahlen. Die künstlich dargestellten Phosphore bestehen aus den Oxyden, Sulfiden und Seleniden der Erdalkalien und des Zinks als „Grundmaterial“, dem Schwermetall Mangan, Silber, Kupfer, Wismut usw., neuerdings auch des Eisens und dem „leicht schmelzbaren Zusatz“ Natriumsulfat, Fluorcalcium und ähnlichem. Letzterer dient nur als Flußmittel und geht nicht in das eigentliche Phosphoreszenzmolekül ein; dieses besteht lediglich aus dem Komplex Grundmaterial-Schwermetall. Die Größe des Phosphoreszenzzentrums, von der die Dauer des Nachleuchtens abhängt, schwankt zwischen 10 und 10000 Erdalkaliatomen. Durch Bestrahlung wird der Leuchtvorgang erregt, die Verteilung der erregenden Strahlen, die ein oder mehrere Maxima aufweist, ist abhängig von der Art des Phosphors. Bei der Erregung werden Elektronen aus dem Schwermetallzentrum ausgetrieben, sie bleiben an den benachbarten elektropositiven Atomen des Phosphoreszenzmoleküls haften und kehren allmählich unter Aussendung einer oder mehrerer für den Phosphor charakteristischen „Emissionsbanden“ in die Ruhelage zurück. Die Dauer dieser Fixierung und daher des Nachleuchtens wird von der Wärmebewegung der Moleküle bestimmt und folglich von der Temperatur des Phosphors stark beeinflußt. Die Farbe des Leuchtens wechselt mit der Temperatur.

Wir untersuchten also die auf die früher beschriebene ¹⁾ Weise hergestellten Zelltrümmer unter der Einwirkung intensiver Bestrahlung mit kurzwelligem Licht und fanden eine Fluoreszenz derselben in gelblich-grüner Bande. Bei der Abkühlung der Zelltrümmer in einer Kältemischung von Kohlensäureschnee—Alkohol

¹⁾ Ph. Ellinger, a. a. O.

nahm die Fluorescenz an Intensität zu, und bei längerem Gefrieren trat eine blauviolette Phosphorescenz auf, die längere Zeit anhielt. Durch Cyanwasserstoff war das Leuchten und Nachleuchten gänzlich unterdrückbar. Es hörte bei der gleichen Blausäurekonzentration auf, bei der auch die Verbrennung von Aminosäuren an den Zelltrümmern zum Erlöschen kam. Da Cyanwasserstoff das einzige bisher bekannte Atmungsgift ist, als dessen Angriffspunkt das Eisen angesehen werden muß, fand sich keine Möglichkeit, eine parallele Beeinflussung von Leuchten und Atmen durch andere Gifte festzustellen. Durch indifferente Narkotica, Alkohol, Äther usw., war die Leuchterscheinung ebensowenig zu beeinflussen wie durch Ammoniak, Amine oder Aldehyde. Bei Tierkohle, als nahezu schwarzem Körper, war eine Lichtemission nicht zu erwarten, und sie konnte auch tatsächlich nicht nachgewiesen werden.

Wenn unsere Voraussetzung richtig war, daß dem Schwermetall bei der Oxydationskatalyse die gleiche Rolle zukommt wie beim Leuchten, dann mußte auch umgekehrt ein Phosphor die Verbrennung von Aminosäuren beschleunigen. Wir bereiteten uns daher eine 2%ige Aufschwemmung eines Phosphors, des Zinksulfidkupfers, in Gelatinelösung, dies um eine feinere Verteilung des Phosphors zu schaffen, und fanden beim Zusatz von Aminosäuren eine Oxydationsbeschleunigung, die in der Größenordnung der an 2%iger Tierkohlesuspension gefundenen etwa gleichkam. Im Gegensatz zu den Vorgängen an Zelltrümmern war weder der Leuchtvorgang, noch der Verbrennungsprozeß an der Zinksulfidkupfer-Gelatineemulsion durch Cyankali zu beeinflussen. Diese Cyankaliresistenz mußte auf die in der Art der Darstellung des Phosphors begründete Form der Schwermetallbindung im Phosphorescenzmolekül zurückgeführt werden, denn die Voraussetzung für die Wirkung der Blausäure ist eine chemische Reaktion zwischen Schwermetall und Blausäure, bei der letztere unter Sauerstoffaufnahme gespalten wird. Während an Zelltrümmern und Tierkohle eine Verbrennung der Blausäure stattfand, wurde diese durch Zinksulfidkupfer nicht angegriffen.

Das Zinksulfidkupfer, in Wasser statt in Gelatinelösung aufgeschwemmt, förderte ebenfalls schon die Oxydationsgeschwindigkeit von Aminosäuren, aber in viel geringerem Maße als bei Gelatinezusatz. An Gelatinelösung allein fand keine Aminosäureverbrennung statt.

Um den Nachweis zu erbringen, daß die Katalyse tatsächlich dem Schwermetallatom zukam, bereiteten wir uns eine Aufschwemmung des Grundmaterials des Phosphors, des Zinksulfids allein, das derselben Behandlung wie der Phosphor unterworfen war, in Gelatinelösung, und ließen auf sie Aminosäurelösung einwirken. Ebensowenig wie ein Leuchten war eine Verbrennung nachweisbar.

Handelte es sich bei dem Leuchten der Zelltrümmer nun wirklich um eine Fluorescenz oder Phosphorescenz, oder lag ihm etwa ein Prozeß zugrunde, den wir als Chemiluminescenz zu bezeichnen pflegen? Wir verstehen hierunter die Eigenschaft, bei chemischen Reaktionen frei werdende Energie in Lichtenergie umzusetzen und als Licht zu emittieren. Daß bei dem beschriebenen Leuchtvorgang eine in dieses Gebiet gehörige Erscheinung nicht vorlag, geht aus folgenden Tatsachen hervor: Das Leuchten tritt nur nach vorhergehender Belichtung auf; doch ist dies nicht unbedingt beweisend, da ja auch der chemische Prozeß durch die Belichtung ausgelöst werden könnte. An den Zelltrümmern geht aber kein nachweisbarer chemischer Prozeß vor sich. Ferner nimmt durch Abkühlung die Leuchterscheinung zu, während chemische Vorgänge hierdurch eingeschränkt werden. Endlich wird durch Cyankali das Leuchten der Zelltrümmer aufgehoben, während gleichzeitig eine sehr energische chemische Reaktion stattfindet.

Nachdem wir einen völligen Parallelismus zwischen dem Leuchten und der Katalyse der Zelltrümmer festgestellt hatten, mußten wir uns die Frage vorlegen: Haben wir es hier mit zwei zufällig zusammentreffenden physikalischen Erscheinungen desselben Materials zu tun oder können wir uns eine Vorstellung machen, die beide Prozesse miteinander verbindet? Der Leuchtvorgang kommt zustande, wenn ein Elektron, das aus einem Schwermetallatom ausgetrieben ist, wieder in

seine Ruhelage zurückkehrt. Da diese Austreibung, die „Erregung“ mit verhältnismäßig geringer Energiezufuhr möglich ist, muß man annehmen, daß hierfür Elektronen der äußersten Schicht in Frage kommen. Auch die chemischen Reaktionen muß man in die äußersten Elektronenschichten des Atoms verlegen. Wenn eine Substanz verbrennt, so wird Sauerstoff aktiviert, d. h. das Sauerstoffmolekül wird aufgespalten in Atome, die Elektrizitätsträger sind. Das Sauerstoffatom muß bei diesem Vorgang Elektronen anlagern. Die Voraussetzung einer katalytisch beschleunigten Oxydation ist eine Erleichterung der Sauerstoffaktivierung. Es liegt nun nahe, die der Wirkung des Eisens bei der Zellatmung zugrunde liegende Oxydationskatalyse in einer derartigen Sauerstoffaktivierung durch vermehrte Elektronenabgabe seitens des Eisens zu sehen. Unterstützt wird diese Anschauung durch Versuche von Schwarz und Friedrich¹⁾ und Wilke²⁾ über die Beeinflussung von Reduktionskatalysen durch Röntgenstrahlen. Schwarz und Friedrich haben die Reduktion von Wasserstoffsuperoxyd durch Platinsol unter der Einwirkung von Röntgenstrahlen beobachtet und eine beträchtliche Hemmung der Reduktionsgeschwindigkeit festgestellt. Die gleiche Beobachtung hat Wilke bei der Reduktion von Kaliumpermanganat durch Wasserstoff gemacht. Der Einfluß von Röntgenstrahlen auf Oxydationskatalysen ist noch nicht untersucht. Wenn die Bedeutung des Katalysators tatsächlich in der Erleichterung der Aktivierung der in Reaktion tretenden Substanz beruht, so muß die für einen Oxydationsprozeß notwendige Elektronenabgabe durch die unter dem Einfluß der Röntgenstrahlen stattfindende negative Aufladung des Katalysators erleichtert werden. Umgekehrt bei einem Reduktionsvorgang: Hier wird der in Reaktion tretende Wasserstoff durch Abgabe eines Elektrons aktiviert. Der Katalysator muß also als Elektronenacceptor dienen, und diese Elektronenaufnahmefähigkeit wird durch negative Aufladung herabgesetzt. Die Versuche von Schwarz und Friedrich und Wilke können, in diesem Sinne gedeutet, unsere Anschauung unterstützen.

¹⁾ R. Schwarz u. W. Friedrich, Chem. Ber. Bd. 55, S. 1040 (1922).

²⁾ E. Wilke, Unveröffentlichte Versuche.

Wir sehen also, daß der von uns gefundene Zusammenhang von Phosphoreszenz und Katalyse sehr wohl auf Grund der elektrochemischen Vorgänge im Atom verstanden werden kann, und müssen als wesentlich für beide Prozesse das Vorhandensein eines Schwermetalls, des Eisens in der Zelle, in ganz bestimmter, bei den Phosphoren leidlich bekannter Struktur annehmen. Über diese Struktur können uns vielleicht später die Röntgendiagramme nach Debye-Scherrer Auskunft geben. Doch reicht bis jetzt die Methode für ein derartig kompliziertes Molekül noch nicht aus.

Wir können also zusammenfassend die Rolle des Eisens bei der Zellatmung als die in seiner Struktur bedingte Fähigkeit bezeichnen, den Sauerstoff durch Elektronenabgabe zu aktivieren und so die Verbrennung des an den Kohleoberflächen verdichteten Brennmateri als zu beschleunigen.

II.

Experimenteller Teil.

A. Fluoreszenz und Phosphoreszenz der Zelltrümmer.

Die Versuche über Fluoreszenz und Phosphoreszenz wurden im hiesigen Radiologischen Institut vorgenommen. Herrn Geheimrat Lenard, der die Ausführung derselben in seinem Institut gestattete, sowie den Herren Dr. F. Schmitt und Dr. R. Tomaschek, deren Unterstützung wir uns zu erfreuen hatten, sei an dieser Stelle aufs verbindlichste gedankt.

Es wurden nach der früher angegebenen Methode¹⁾ Zelltrümmer durch Gefrieren und Wiederauftauen von Gänseerythrocyten mit darauf folgenden stundenlangen Waschungen in Ringerlösung hergestellt. Das zur Prüfung kommende Material stellte eine weiße Emulsion dar, an der kein spontaner Sauerstoffverbrauch festgestellt werden konnte. Zur Untersuchung auf ihre Leuchtfähigkeit brachten wir einen Teil der in der Zentrifuge auf das Zehnfache eingeeengten Zelltrümmeremulsion auf ein Metallschiffchen, kühlten dieses auf Kohlensäureschneegut ab und setzten es nun der Bestrahlung aus. Die Lichtquelle bestand

¹⁾ Ph. Ellinger, a. a. O.

aus einem zwischen Magnesiumelektroden unter Wasser überspringenden elektrischen Funken, dessen Licht durch ein System von Quarzprismen spektral zerlegt war. Die Grenze des Spektrums im Ultraviolett lag bei $215\ \mu\mu$. Die Zelltrümmer fluorescierten in rötlich-gelbem Licht, und zwar um so intensiver, je stärker sie abgekühlt wurden. Zunächst wurde die Erregungsverteilung bestimmt; sie geht aus der folgenden Kurve hervor.

Kurve 1.

Es sind 2 Erregungszonen vorhanden zwischen 400 und $270\ \mu\mu$ mit einem Höhepunkt bei $330\ \mu\mu$, die zweite bei $250\ \mu\mu$ beginnend und nach dem Ultraviolett zu ansteigend bis zur Grenze des von uns benutzten Spektrums.

Mit einem lichtstarken Spektroskop wurde die Lage der Emissionsbande bestimmt. Diese liegt zwischen $600\ \mu\mu$ und $470\ \mu\mu$, ihr Maximum bei $570\ \mu\mu$.

Wurden die Zelltrümmer in einem Quarzgefäß mit einer Kältemischung von Kohlensäureschnee mit Alkohol völlig gefroren, so konnte bei Bestrahlung eine deutliche und lange an-

Kurve 2.

Kurve 3.

haltende Phosphoreszenz in bläulichem Licht beobachtet werden. Die Lage der Emissionsbande wurde mit dem Spektroskop gemessen. Wie aus Kurve drei ersichtlich ist, liegt sie zwischen $570\ \mu\mu$ und $430\ \mu\mu$ und hat zwei Maxima bei $525\ \mu\mu$ und $450\ \mu\mu$.

Nun untersuchten wir, ob das Leuchten der Zelltrümmer durch Zusatz von Cyankali, Äthylalkohol, Äthyläther, Urethan, Ammoniak oder Trimethylamin zu beeinflussen sei. Von diesen

war nur das Cyankali auf die Fluorescenz von Wirkung. Zur näheren Untersuchung des Einflusses von Cyankali verwendeten wir eine Lösung, die mit Essigsäure bis zu ungefähr neutraler Reaktion abgestumpft und mit einem Gemisch von primärem und sekundärem Natriumphosphat auf p_H 7,1 gepuffert war. Bei einer Cyankalikonzentration von 1,6 % war das Leuchten der Zelltrümmer noch deutlich, wenn auch schon abgeschwächt, bei 2,1 % war es noch eben bemerkbar und bei 3,2 % Cyankali vollständig verschwunden. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß das Cyankali bei Zimmertemperatur einige Zeit einwirken konnte und zur Prüfung der Fluorescenz das Gemisch im Kohlensäureschnee abgekühlt wurde.

Mit demselben Zelltrümmersmaterial und der gleichen CyankalistammLösung wurde die Beeinflussung der Oxydationsgeschwindigkeit untersucht. Die Ergebnisse sind im Abschnitte B, 3 beschrieben.

B. Bestimmung der Oxydationsgeschwindigkeit unter dem Einfluß von Cyankali.

1. Methodik.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte mit der von Siebeck verbesserten Barcroft'schen Anordnung auf die gleiche Art, wie sie Ellinger in einer früheren Arbeit¹⁾ angewandt hatte. Das Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeit war 2 oder 3 ccm, die Reaktionstemperatur lag bei den verschiedenen Versuchen zwischen 37,6° und 40,2°, war aber während des gleichen Versuchs auf 0,2° konstant. Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs geschah nach der von Siebeck²⁾ angegebenen Formel

$$v = \frac{p \cdot v_0}{10000 (1 + \alpha t)}.$$

Die Oxydationen erfolgten in Luft.

2. Die Verbrennung von Aminosäuren an Zinksulfidkupfer.

Zinksulfidkupfer wurde in einer Konzentration von 2 % zur Vergrößerung der Oberfläche in einer 5 % igen Gelatinelösung auf-

¹⁾ Ph. Ellinger, a. a. O.

²⁾ R. Siebek in Abderhaldens Hdb. der biochem. Arbeitsmethoden. Bd. 8, S. 31. Urban u. Schwarzenberg, Berlin u. Wien 1915.

geschwemmt und in den Oxydationsgefäßen mit dem Brennmaterial zusammengebracht. Als solches benutzten wir eine mit Phosphatgemisch auf pH 7,3 gepufferte 3% ige Lösung von Testesopton, welches, wie Ellinger¹⁾ festgestellt hat, an Tierkohle und Zelltrümmern entsprechend seinem Aminosäuregehalt verbrannt wird. Daneben wurde das Zinksulfidkupfer in Wasser suspendiert und mit Testesopton zusammengebracht. Endlich wurde zum Vergleich die Verbrennung des Testesopton an Tierkohle beobachtet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle I.

System		O ₂ -Verbrauch in cmm nach	
		60 Minuten	100 Minuten
1,0 Tierkohle 2% . .	1,0 Testesopton 3%	38,2	53,4
1,0 ZnSCu-Gelatine . .	1,0 „ 3%	27,9	37,1
1,0 ZnSCu-Wasser . .	1,0 „ 3%	20,9	28,6

Das Zinksulfidkupfer zeigte also die Fähigkeit, die Verbrennung von Testesopton zu beschleunigen.

Ein Zubringen von Cyankali zu der Zinksulfidkupfer-Gelatine-Emulsion blieb ohne Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit gegenüber einer cyankalifreien Kontrolle. Eine Ausschaltung des Kupfers durch Cyankali war auf diese Weise also nicht möglich. Auch die Phosphoreszenz des Zinksulfidkupfer konnte durch Cyankali nicht beeinflußt werden.

Cyankali, das wir ohne Brennmaterial zu Zinksulfidkupfer-Gelatine-Emulsion hinzufügten, zeigte keinen Sauerstoffverbrauch.

Um zu prüfen, ob das Grundmaterial als solches die Verbrennung schon fördert, stellten wir uns reines Zinksulfid dar und glühten es aus, so daß es bis auf die fehlende Kupferbeimengung dem bisher angewandten Phosphor vollständig glich. Wir hatten nun ein nicht mehr phosphoreszierendes weißes Pulver, von dem wir uns eine 2% ige Aufschwemmung in 5% iger Gelatine bereiteten. Zugefügte 3% ige Testesoptonlösung zeigte keinen Sauerstoffverbrauch. So war die Eigen-

¹⁾ Ph. Ellinger, a. a. O.

schaft des Zinkulfidkupfers festgestellt, neben einer Phosphoreszenz Oxydationen von Aminosäuren durch Luftsauerstoff katalytisch zu beschleunigen.

3. Versuche an Zelltrümmern.

Nachdem es uns in den oben beschriebenen Versuchen gelungen war, die Phosphoreszenz der Zelltrümmer und ihre Hemmung durch Cyankali nachzuweisen, untersuchten wir nun die quantitativen Verhältnisse bei der Cyankalihemmung der Zelltrümmeratmung. Verwendet wurde ein Teil der gleichen Zelltrümmer, mit denen die Leuchtversuche vorgenommen waren. Es wurde Zelltrümmer-Emulsion und 3‰ige Tyrosinlösung mit durch Phosphatgemisch auf p_H 7,1 gepufferter, vorher mit Essigsäure neutralisierter Cyankalilösung in steigenden Konzentrationen zusammen beobachtet und der Sauerstoffverbrauch gemessen. Der Cyankaligehalt der zugesetzten Lösungen war titrimetrisch nach der Methode von Volhard bestimmt. Die gefundenen Werte sind aus folgender Tabelle ersichtlich.

Tabelle II.

System			KCN-Konzentration	O ₂ -Verbrauch in cmm nach		
				1 St.	2 St.	3 St.
0,8 Zelltrümmer	1,0 Tyrosin 3 ‰	0,2 Pufferlösung		6,3	12,7	17,3
"	"	0,2 KCN 0,29 ‰	0,029 ‰	8,4	13,1	17,0
"	"	0,2 " 0,58 "	0,058 "	5,2	10,1	8,0
"	"	0,2 " 1,16 "	0,116 "	0,5	5,3	5,7
"	"	0,2 " 2,32 "	0,232 "	9,2	14,5	19,3
"	"	0,2 " 4,64 "	0,464 "	11,8	20,2	24,0
"	"	0,2 " 11,6 "	1,16 "	17,8	29,2	37,0
"	"	0,2 " 23,2 "	2,32 "	22,1	36,3	49,2
"	"	0,4 " 23,2 "	4,22 "	29,9	54,4	76,6

Der Sauerstoffverbrauch sank bei zunehmender Cyankalikonzentration zunächst rasch ab und stieg erst schnell, dann langsam wieder an. Der Tiefpunkt der Sauerstoffverbrauchs-kurve liegt bei einer Gesamtkonzentration von 0,116‰ Cyan-

kali. Die Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs an diesem Punkte beträgt nach 3 Stunden 67%. Die Form der Kurve und die Beobachtung Warburgs¹⁾, daß Cyankali an Tierkohle einen Sauerstoffverbrauch zeigt, ließen uns vermuten, daß die Abnahme der Hemmung bei größerer Cyankalikonzentration vielleicht auf einer Verbrennung des Cyankali an den Zelltrümmern zurückzuführen sei. Wir untersuchten daher das Verhalten von Cyankali in verschiedenen Konzentrationen an Zelltrümmern ohne Zusatz von Brennmateriel. Tabelle III gibt über die Ergebnisse Auskunft.

Tabelle III.

System		KCN-Konzentration	O ₂ -Verbrauch in ccm nach		
			1 St.	2 St.	3 St.
0,8 Zelltrümmer	1,0 Pufferlösung	0,2 KCN 0,29 ‰	0,029	2,3	4,7
"	"	0,2 " 0,58 "	0,058	3,6	7,5
"	"	0,2 " 1,16 "	0,116	5,8	9,2
"	"	0,2 " 2,32 "	0,232	7,1	13,5
"	"	0,2 " 4,64 "	0,464	9,9	17,1
"	"	0,2 " 11,6 "	1,16	13,7	17,4
"	"	0,2 " 23,2 "	2,32	22,5	37,2
"	"	0,4 " 23,2 "	4,22	30,2	54,6

Wir sehen einen zunehmenden Sauerstoffverbrauch mit steigendem Cyankaligehalt. Die Größe des Sauerstoffverbrauchs erreicht bei einer Konzentration von 2,32 ‰ den Sauerstoffverbrauch des Tyrosin-Zelltrümmer-Cyankali-Systems und deckt sich von hier ab mit letzterem. Man muß also annehmen, daß die bei der Beeinflussung der Tyrosin-Zelltrümmer-Oxydation durch Cyankali gefundene Kurve (vgl. Kurve IV und V) die Resultante darstellt aus dem zunehmend gehemmten Sauerstoffverbrauch der Tyrosinverbrennung und dem zunehmend gesteigerten Verbrauch für die Cyankali-Oxydation. Kurve IV gibt den Sauerstoffverbrauch an Zelltrümmern und Tierkohlesuspension, sowie von Gänseerythrocyten bei wechselnden

¹⁾ O. Warburg, Biochem. Zs. Bd. 119, S. 134 (1921).

Kurve 4.

Kurve 5.

Cyankalikonzentrationen in 3 Stunden wieder, Kurve V den Sauerstoffverbrauch von Cyankali in verschiedenen Mengenverhältnissen an Zelltrümmern und Tierkohlesuspension.

4. Versuche an Tierkohle.

Eine Nachprüfung des eben beschriebenen Verhaltens des Cyankali an Tierkohle führt zu entsprechenden Ergebnissen. Eine 2% ige Tierkohlesuspension in 0,3% iger Tyrosinlösung wurde mit Cyankali in steigenden Konzentrationen beobachtet.

- Tabelle IV.

System			KCN-Konzentration	O ₂ -Verbrauch in cmm nach		
				1 St.	2 St.	3 St.
0,02 g Tierkohle	1,0 Tyrosin 3% ₀₀	1,0 Pufferlösung pH 7,1	0	26,1	44,4	69,6
"	"	1,0 KCN 0,116% ₀₀	0,058% ₀₀	10,8	14,1	28,7
"	"	1,0 " 0,232 "	0,116 "	6,6	13,3	22,2
"	"	1,0 " 0,464 "	0,232 "	12,3	17,8	25,8
"	"	1,0 " 0,928 "	0,464 "	17,0	32,6	40,7
"	"	1,0 " 1,856 "	0,928 "	20,4	40,7	52,1
"	"	1,0 " 3,712 "	1,856 "	69,2	133,7	—

Zur Kontrolle prüften wir das Verhalten der einzelnen Cyankali-Konzentrationen an 2% iger Tierkohle allein:

Tabelle V.

System			KCN-Konzentration	O ₂ -Verbrauch in cmm nach		
				1 St.	2 St.	3 St.
0,02 g Tierkohle	1,0 aq. dest.	1,0 KCN 0,116% ₀₀	0,058% ₀₀	4,7	6,8	9,5
"	"	1,0 " 0,232 "	0,116 "	6,3	8,4	12,4
"	"	1,0 " 0,464 "	0,232 "	13,0	12,5	11,6
"	"	1,0 " 0,928 "	0,464 "	12,9	19,9	24,5
"	"	1,0 " 1,856 "	0,928 "	13,6	23,9	26,4
"	"	1,0 " 2,45 "	1,225 "	24,6	49,7	—
"	"	1,0 " 4,9 "	2,45 "	47,9	—	—
"	"	1,0 " 9,8 "	4,9 "	99,5	147,2	—
"	"	1,0 " 19,6 "	9,8 "	188,9	283,5	—

5. Versuche an roten Gänseblutzellen.

Die Ergebnisse an Tierkohle und Zelltrümmern veranlaßten uns, auch an intakten roten Blutkörperchen die Beeinflussung der Atmung durch verschiedene KCN-Konzentrationen zu untersuchen. Nachdem wir Gänseblut dreimal mit Ringerlösung gewaschen hatten, schwemmten wir die Blutkörperchen in einer dem Ausgangsvolumen des Blutes entsprechenden Menge Ringerlösung auf, welche mit Phosphatgemisch auf p_H 7,3 gepuffert war und fanden für ihren Sauerstoffverbrauch bei Zusatz von verschiedenen Cyankalikkonzentrationen folgende Werte:

Tabelle VI.

System		KCN-Konzentration	O ₂ -Verbrauch in mm ³ nach		
			1 Std.	2 Std.	2 Std.
1,0 Blutkörperchen	1,0 Ringer	0	32,5	49,6	64,5
"	1,0 KCN 0,232‰	0,116‰	17,1	21,4	25,5
"	1,0 " 0,464 "	0,232 "	6,0	9,8	11,4
"	1,0 " 0,696 "	0,348 "	11,9	16,4	20,8
"	1,0 " 0,928 "	0,464 "	20,6	28,2	33,4
"	1,0 " 0,392 "	0,696 "	22,0	30,2	35,9
"	1,0 " 0,856 "	0,928 "	23,7	30,8	38,5
"	1,0 " 2,32 "	1,16 "	24,8	39,0	46,2
"	1,0 " 3,48 "	1,74 "	38,7	55,5	67,0
"	1,0 " 4,64 "	2,32 "	39,2	65,2	74,2
"	1,0 " 6,96 "	3,48 "	43,4	80,9	111,0

Auch hier fanden wir die gleiche Form der Hemmungskurve (siehe Kurve IV), nur lag der Tiefpunkt des Sauerstoffverbrauches erst bei einer Cyankalikkonzentration von 0,232‰, also bei höherem Cyankaligehalt als an Zelltrümmern und Tierkohle. Dieser Unterschied wird verständlich durch die folgenden Untersuchungen.

6. Bestimmung des Eisengehalts.

Wir bestimmten den Eisengehalt nach Neumann¹⁾ und fanden in 100 mg Tierkohle 0,14 mg Eisen. In 20 mg Tier-

¹⁾ E. Abderhalden, Handbuch d. biochemischen Arbeitsmethoden Bd. 1, S. 413. Urban u. Schwarzenberg, Berlin u. Wien 1910.

kohle, der Menge, welche in den einzelnen Oxydationsgefäßen war, befand sich also 0,028 mg Eisen. 1 ccm Zelltrümmeremulsion enthielt 0,031 mg Eisen und 1 ccm Blutkörperchenaufschwemmung 0,74 mg Eisen, davon entfällt bei den Erythrocyten der weitaus größte Teil auf den Blutfarbstoff und kommt für die Blausäurehemmung wohl nicht in Betracht.

7. Messung der Zyankaliverbrennung.

Nun galt es zu untersuchen, ob tatsächlich das Cyankali verbrannt wurde. Wir bestimmten also den Gehalt vor und nach der Einwirkung auf Tierkohle durch Titration nach Volhard. Da es möglich war, daß die Verbrennung nur bis zur Entstehung von Cyanaterfolgte, andererseits mit der Volhardschen Methode dieses stets zusammen mit dem Cyanid bestimmt wird, wandten wir eine Methode an, mit der man Cyanat neben Cyanid nachweisen kann.

Wir verfahren nach den Angaben von Victor.¹⁾ Seine Methode beruht darauf, daß das Silbercyanat im Gegensatz zum Silbercyanid in verdünnter Salpetersäure löslich ist. Man fällte zwei gleiche Portionen der zu untersuchenden Substanz mit einer abgemessenen Menge n/10-Silbernitratlösung und behandelte den einen der entstandenen Niederschläge mit verdünnter Salpetersäure. Nachdem man die Niederschläge beider Proben abfiltriert hatte, bestimmte man im Filtrat, nach den Angaben Volhards, das überschüssige Silbernitrat mit n/10 Rhodanatlösung. Aus der Differenz beider Bestimmungen erhielt man die für Cyanid allein verbrauchte Menge n/10 Silbernitratlösung und konnte somit auch den Gehalt von Cyanat berechnen. Es konnte jedoch in keinem Falle Cyanat neben Cyanid nachgewiesen werden.

50 ccm einer mit Essigsäure neutralisierten 1,98‰igen Cyankalilösung wurden mit 1 g Tierkohle 5 Minuten lang geschüttelt, darauf 10 Minuten zentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit wurde 1 ccm abgehoben und nach Volhard titriert; wir fanden 1,91‰ Cyankali; also beträgt die Adsorption des Cyankali an Tierkohle nur 3,5‰. Nun wurde das Gefäß 7 Stunden lang im Schüttelapparat geschüttelt, zentrifugiert und 1 ccm nach Victor titriert. Sowohl Kaliumcyanid als auch Kaliumcyanat konnten nicht mehr nachgewiesen werden, es war restlos verbrannt.

8. Versuche an Froschmuskulatur.

Die Beobachtung, daß die Hemmung der Verbrennung durch Cyankali einen bestimmten Grad niemals überschreitet,

¹⁾ E. Victor, Zs. analyt. Chem. Bd. 40, S. 462 (1910).

und daß ein Maximum bei niedrigerer Konzentration erreicht wird, wurde auch von Lipschitz und Gottschalk¹⁾ in Versuchen an Froschmuskulatur gemacht. Sie fanden eine zweiphasige Hemmungskurve und begründeten auf diese Erscheinung die Theorie, daß durch Cyankali der der Atmung zugrunde liegende Oxydationsprozeß bei niedrigem Cyankaligehalt gehemmt würde und bei zunehmender Konzentration aber an Stelle des Atmungsvorgangs dann eine gärungsformige Dehydrierung erfolge. Nach unseren Versuchen an Tierkohle, Zelltrümmern und Erythrocyten ist es wahrscheinlich, daß auch die von Lipschitz und Gottschalk gefundene Cyankali-Hemmungskurve durch die Cyankaliverbrennung bedingt wird.

Wir untersuchten daher die Beeinflussung der Sauerstoffatmung an nach den Angaben von Lipschitz und Gottschalk gewonnener Froschmuskulatur durch verschiedene Cyankalikonzentrationen, ferner den Sauerstoffverbrauch von gewaschener, nicht mehr spontan atmender Froschmuskulatur bei Zusatz von Cyankali, und endlich bestimmten wir die Abnahme des Cyankaligehalts beim Schütteln von Froschmuskulatur mit Cyankali. Die folgende Tabelle gibt den Sauerstoffverbrauch der Froschmuskulatur mit verschiedenen Cyankalikonzentrationen wieder:

Tabelle VII.

System		KCN-Konzentration	O ₂ -Verbrauch in mm ³ nach	
			1 Std.	2 1/2 Std.
2,0 Muskulatur	1,0 Ringerlösung	0	23,4	48,7
"	1,0 KCN 0,06 ‰	0,02 ‰	6,4	18,6
"	1,0 " 0,24 "	0,08 "	10,3	19,5
"	1,0 " 0,495 "	0,165 "	13,7	21,4
"	1,0 " 0,99 "	0,33 "	15,5	37,2
"	1,0 " 1,98 "	0,66 "	29,3	45,6

Sie zeigt eine maximale Hemmung des Sauerstoffverbrauchs bei einer Blausäurekonzentration von 0,6 ‰ mit starkem Anstieg desselben bei höherem Blausäuregehalt. Auch an ausgewaschener Froschmuskulatur verbrennt Cyankali, wobei der

¹⁾ W. Lipschitz u. A. Gottschalk, Pfügers Arch. Bd. 191, S. 1 (1921).

Sauerstoffverbrauch mit steigendem Cyankaligehalt wächst, wie aus Tabell VIII hervorgeht.

Tabelle VIII.

System		KCN-Konzentration	O ₂ -Verbrauch in mm ³ nach	
			1 Std.	2 Std.
2,0 gewaschene Muskulatur	1,0 aq. dest	0	0,2	0
	1,0 KCN 0,06 ‰	0,02 ‰	9,0	13,3
	1,0 „ 0,12 „	0,04 „	5,7	14,7
	1,0 „ 0,24 „	0,08 „	7,0	16,8
	1,0 „ 0,495 „	0,16 „	18,6	22,9
	1,0 „ 0,99 „	0,33 „	25,4	31,6
	1,0 „ 1,98 „	0,66 „	43,4	55,2

Schließlich maßen wir quantitativ die Verbrennung des Cyankali an Froschmuskulatur. 20 g Muskulatur wurden mit 50 ccm auf p_H 7,2 gepufferter Ringerlösung 5 Minuten geschüttelt, zentrifugiert und 1 ccm nach Volhard titriert; es wurde 1,31 ccm 1/10 normal Silbernitratlösung und zwar von den Chloriden der Lösung verbraucht. Diese Menge war also von der später zu findenden abzuziehen, um die wirkliche Cyankalimenge zu finden. Wir fügten nun 2,5 ccm einer Cyankalilösung hinzu, deren Gehalt titrimetrisch auf 3,9 ‰ festgestellt war, schüttelten es gut durch und zentrifugierten. 1 ccm davon verbrauchte jetzt 1,63 ccm 1/10 normal Silbernitratlösung, also für Cyankali allein 1,63—1,31 = 0,32 1/10 normal Silbernitratlösung; d. h. es waren 2,112 ‰ Cyankali am Anfang des Versuchs in der Lösung. Nun wurde das Gefäß 13 Stunden lang im Thermostat bei 36,5° unter Luftzufuhr geschüttelt, danach zentrifugiert und 1 ccm titriert. Es wurden 1,42 ccm 1/10 normal Silbernitratlösung verbraucht, also für Cyankali allein 1,42—1,31 = 0,11 ccm 1/10 normal Silbernitratlösung. Umgerechnet ergibt sich 0,726 ‰ Cyankali.

Am Schlusse des Versuchs waren also nur noch 34,4 ‰ der Ausgangsmenge Cyankali übrig, 65,6 ‰ waren verbrannt.

Nach diesen Feststellungen müssen wir demnach an Stelle der von Lipschitz und Gottschalk für die Hemmungskurve der Atmung durch Cyankali gegebenen Deutung die auch von uns beobachtete zweiphasige Kurve als die Resultante der abnehmenden Oxydation des Brennmateri als die Resultante der zunehmenden Verbrennung der Blausäure ansehen.