(Aus dem Chemisch-physiologischen Laboratorium des Allgem. Krkh. Hamburg-Barmbeck.)

Über Cholesterinämie.

I. Mitteilung.

**Vergleichende Untersuchungen zur Methodik
mit besonderer Berücksichtigung der colorimetrischen Verfahren.**

Von
Joh. Feigl.

(Eingegangen am 4. August 1920.)

Einleitung.

Untersuchungen über die Physiologie und Pathologie des Vorkommens, der Eingliederung, der Bindungsformen und der Beziehungen des Cholesterins im Blute des Menschen sind in neuer Zeit, vornehmlich vom Jahre 1912 an, häufiger angestellt worden und haben angesichts der Tatsache, daß gegen die normalen Verhältnisse unter krankhaften Vorbedingungen nicht unbeträchtliche Abweichungen erweislich sein können, ein gewisses Interesse auf seiten der Kliniker wie der Biochemiker, außerdem aber Methodologen auf sich vereinigt.

Mit nur wenigen Ausnahmen sind bis in die letzte Zeit hinein die Ausführungsformen der chemischen Erkenntnismittel ziemlich stabil geblieben. In die jüngsten maßgebenden Publikationen zur Frage der pathologischen Umstimmungen des gesamten Cholesterinspiegels im menschlichen Blute sind die derzeitigen Probleme der systematischen Methodologie nur zum Teil hineingetragen worden.

Innerhalb dieser handelt es sich keineswegs um einigermaßen gefestigte Standpunkte, vielmehr in der Hauptsache um neu angebahnte oder noch umstrittene Möglichkeiten, die auch zur Zeit auf die aus ihnen abgeleiteten, theoretischen und praktischen Folgerungen Einfluß ausüben müssen. Diesen Erwägungen und systematisch-kritischen Studien ist bis heute nicht ausreichend Genüge getan worden.

Überblickt man nun das beschreibende Material, welches zahlreiche Forscher aus der menschlichen Pathologie zu gewinnen trachteten und in verschiedenen Arbeitsrichtungen zusammentrugen, so kann man sich dem Eindrücke nicht entziehen, daß nur ein kleiner Teil der Möglich-

keiten klar wiedergegeben, teils der Hauptsache nach umgrenzt, teils nur angeschnitten ist.

Von annähernder Übereinstimmung der Einzelheiten beschreibender Beobachtungen und der aus ihnen formulierten Urteile ist kaum die Rede.

Man darf auch sagen, daß manche einschlägigen Aufgaben nicht wesentlich von der Stelle geraten sind, weil Methodologie und Methodenkritik mit ihren Richtungsänderungen und gewandelten Standpunkten nicht gebührend in die Auswertung Eingang fanden. Andererseits sind die Beziehungen der Cholesterinfraktion allermeist vernachlässigt worden, in denen sie zu den Fetten und Lipoiden, wie zu der sonstigen Zusammensetzung der Blutflüssigkeit steht.

Fragen wie diejenigen, welche darauf abzielen, über eine pathologisch-klinische Beurteilung der Werte zu befinden, bleiben in der Hauptsache Stückwerk, wenn nicht vorgängig zur Aufklärung der Wechselbeziehungen ein Teil der Ursächlichkeit von typischen wie sonstigen Vorkommnissen näher geklärt und belegt worden ist. Diese Vorarbeit fehlt in allen Untersuchungsreihen, welche sich mit der Durchführung und Verwertung isolierter Cholesterinbeobachtungen beschäftigen und wird ganz besonders vermißt da, wo mit ganzem Blute schlechthin experimentiert wurde. Solches Vorgehen mag an sich berechtigt sein, beraubt aber sich und die gedachten Ziele eines beträchtlichen Teiles aller Möglichkeiten.

Überblicken wir nun die gesamte spezialistische Literatur der vorliegenden Aufgabe, so sehen wir, daß die große Hauptmenge aller einschlägigen Arbeiten mit isolierten Befunden über das Gesamtcholesterin argumentiert. Die einschlägigen Beobachtungen und Anschauungen werden uns in gedrängter Kürze zusammenhängend, wie späterhin bei den einzelnen Abschnitten der pathologischen Cholesterinämie, beschäftigen.

In dieser ersten Gruppe stehen zeitlich an erster Stelle die Arbeiten französischer Autoren, welche auf der Methodik von Grigaut fußen. Chauffard, Laroche, Grigaut haben einen größeren Teil der Pathologie des Blutcholesterins beforstet. Es folgten Untersuchungsreihen von Henes, welche z. T. auf dieser Methodik, z. T. auf Arbeitsformen der Amerikaner Weston und Kent beruhen. Ein amerikanischer Autor, Schmidt, ging ebenso vor. Iscovesco betrat zugleich mit neuartiger Methodik Gebiete des Vorkommens, Defaye folgte mit kritischen Äußerungen.

Einen neuen Impuls erhielt das Gebiet, namentlich bei deutschen Autoren, durch die Ausarbeitung des prompten und von vielen Seiten bevorzugten Verfahrens von Authenrieth und Funk. Dieses gab Gelegenheit zu Untersuchungen auch einfacheren Charakters, welche ihrem Werte nach mit den maßgebenden nicht auf eine Stufe gestellt werden dürfen. Es folgen die pathologischen Experimentalarbeiten von Wacker und Hueck, denen von Klein und Dinkin, von Picard, von Bauer und Skutetzky, von Baumeister und Havers, von Weltmann, von Pribram, jüngst die umfassende von Denis und zuletzt die neuesten von Stepp u. a. sich anschlossen.

Spezialistischen Fragestellungen sind zugewandt die Arbeiten von Wacker und Hueck (Pathologie der Nebenniere), von Schmidt (Xanthorose), von Klein und Dinkin, wie von Pighini (Tabes und Paralyse), von Stein (Lues und Cholesterin) u. a. Eine historisch-kritische Zusammenstellung stammt von Pribram.

Während es sich in dieser Gruppe vorwiegend um beschreibende Arbeit allgemeineren Charakters und auf der Basis isolierter Cholesterinuntersuchungen handelt, hat eine Reihe von Forschern, zum Teil mit gänzlich anderen Methoden, die Cholesterinämie als Teilerscheinung des lipämischen Komplexes vor Augen gehabt.

Abgesehen von älteren Arbeiten geht die Entwicklung hierin über eine Mitteilung von Klemperer und Umber, die aus ihren Befunden den späterhin oft benutzten Begriff der „Lipoidämie“ formulierten. Dem gedachten Kreise gehören an Arbeiten von Hermann und Neumann (Gravidität), von Lindemann, von Medak, von King (Cholesterin und „hämolytische“ Bluterkrankung), von Kauders, von Bürger und Schweissheimer (experimenteller Alkoholismus), von Boggs und Morris, Pratt, Sakai (Anämieproben) u. a. Hier spielen auch die systematischen Arbeiten der Schule von S. Fraenkel eine Rolle. Die Untersuchungen von Bang und Forssmann haben vielfach als Grundlage der Betrachtung gedient.

Diese Forschungen sind in der jüngsten Zeit durch den Impuls neuartiger methodischer Studien von W. R. Bloor beträchtlich angeregt worden.

Der Autor gab umfassende Beschreibungen und ging später (mit Joslin und Horner) u. a. auf das Diabetesproblem über. Die Erkenntnismittel gerieten z. T. in das Getriebe kritischer Nachprüfungen, an deren Weston, Müller, Feigl, Csonka, Myers u. a. arbeiteten. Doch kann davon gesprochen werden, daß das System analytischer und rechnerischer Methoden ferner Aussichten bietet. Seit 1917 hat Feigl verschiedene Gebiete systematisch beforscht (s. u.). Ganz kürzlich teilte J. Bang sein mikroanalytisches System mit.

Abgesehen von älteren Anläufen über die fraglichen Aufgaben haben (1913) Beumer und Bürger ausgezeichnete chemische Blutuntersuchungen an Typen von pathologischen Umstimmungen ausgeführt.

In diesen spielte nicht nur die Eingliederung des Cholesterins in den lipämischen Komplex eine Rolle; es tritt hinzu die Untersuchung über seinen Zustand (Esterbindung, nach Windaus). Darüber hinaus gehen Bestimmungen der Konzentration, der Verteilung von Fett und Lipoid auf Plasma und Erythrocyten u. a. m.

Die Differentialanalyse von Erythrocyten und Plasma wird bereits in einigen Arbeiten dieser Gruppe berücksichtigt, teils in Spezialproblemen, teils in Form eines Analysenganges (Bloor). Die kritischen Anschauungen von Bönninger wie von Falta müßten in diese Angelegenheit hineingetragen werden.

Eine Vereinigung des Programms von Beumer und Bürger mit neuesten Methoden der Untersuchung von Fetten und Lipoiden, mit dem Problem der Verteilung im Blute, mit der Ausstattung durch fernere

Befunde, mit Erweiterung der pathologischen Gesichtspunkte stellen Mitteilungen des einen von uns (Feigl) dar¹⁾.

Von Interesse sind besonders Beziehungen zum Zucker und zum Reststickstoff, zu Farbstoffen und Chromogenen (Bilirubin und Hämatin).

Eine gleichfalls neue, tierpathologische Arbeit von Rudolf über Lipämie bei kranken Pferden betritt das Gebiet der Theorie, die von Bacmeister, von Wacker, von Nachuntersuchern und Berichterstattem historisch und kritisch beschrieben und erweitert worden war. R. G. Myers beforschte Wirbellose und Fische.

Eingehendere Angaben über die Glieder des lipämischen Komplexes finden sich bei Terroine, Meyer und Schäffer, Bloor, auch bei Feigl und bei Bang.

Durch die neueren Arbeiten (bes. Beumer und Bürger, Bloor, Feigl u. a.) zieht sich die Ermittlung des Verhältnisses von freiem und gebundenem Cholesterin. Ruhend auf der klassischen Beobachtung von Windaus über die Digitoninbindung, ist diese Methode von Hermann und Neumann, von Kauders, Thaysen, Fex u. a. in größerem Maßstabe benutzt worden, bis der Analyse des Blutcholesterins durch Bloor (mit Knudson) die expeditiv, mikrochemische Ausführung auch dieses Zweiges geschenkt wurde, deren sich Bloor und Feigl bei deskriptiven Beobachtungen bedienten. Bangs System vollzieht die Aufteilung auf gleicher Basis in weiter Abwandlung. Die Aufklärung der Esterquote gehört mit zum Problem der Cholesterinämie, und zwar unter Umständen an entscheidender Stelle. Diese Aufgabe ist, wie die kurzen Angaben zeigen, in den Großteil der Arbeiten über Cholesterinämie nicht hineingetragen worden und fehlt u. a. auch in den jüngsten Mitteilungen, der wichtigen Publikation von Denis wie bei Stepp u. a., die Gesamtcholesterin bearbeiten.

In engem Zusammenhange mit den neuen Methoden stehen Arbeiten, welche das Oxycholesterin ins Auge zu fassen bestrebt sind. Diese Angelegenheit ruht ganz auf den Schultern von Lifschütz, der sie auf analytischem und experimentellem Wege erst gangbar machte, so daß sie in die kritische Methodologie Eingang finden könnten. Es folgten Mitteilungen von Schreiber und Lenard u. a. m.

Von erheblicher Bedeutung ist die nach obigem nur sehr wenig be-

¹⁾ Sie umfassen bisher die spezialistische Beschreibung der akuten gelben Leberatrophie (mit Luce), das Verhalten von Iranition, Unterernährung, Ödemkrankheit, Avitaminosen (s. a. Knack und Neumann), die Verhältnisse bei Tabes und Paralyse, die verschiedenen Formen des Stauungsikterus, die diabetische Lipämie, den schwersten akuten und den chronischen Alkoholismus des Menschen, Bluterkrankungen. Diese Untersuchungen sollen mit der erwünschten Neuorientierung, welche vor allem der Lecithirämie zugute kommt, die einschlägigen Beziehungen umfassender und genauer zur Darstellung bringen, als es ältere Arbeiten vermochten.

forschte Aufgabe (außer den Untersuchern des Lipämiekomplexes besonders von Klein und Dinkin, von Henes, Kauders, Klinkert, von Fex) der Verteilung von freiem und verestertem Cholesterin auf die Elemente der Blutflüssigkeit. In diesem Punkte beschneiden sich viele auch der neuesten Arbeiten (Stein, Denis, Stepp u. a.) ihre Ausichten mehr oder minder erheblich. Viele Fragen dürfen nur von Plasma, andere auch von den Körperchen aus gestellt und diskutiert werden. Sie gewinnen Durchsichtigkeit besonders dann, wenn die vergleichende chemische und cytologische Beschreibung ergiebig genug ist.

Die grundlegende Aufgabe der physiologischen Cholesterinämie (Nüchternwerte, alimentäre Voraussetzungen, Arbeitsleistung, Lebensalter) beschäftigt uns in einem selbständigen Abschnitte. Dieser Aufgabe wurden bisher nicht genügende Bemühungen gewidmet, wenn auch bei den amerikanischen Forschern (Denis, Bloor, Gettler), bei Feigl, Klein und Dinkin, bei Henes u. a. Angaben von einiger Breite vorliegen.

Wesentlich ist im Stande unserer Kenntnisse über die Erscheinungen der Cholesterinämie das auf biochemischem Gebiete sonst in diesem Grade nicht bestehende Auseinanderweichen von Methoden und Ergebnissen. Differieren schon erste in wesentlichen Zügen, so ist das *cet. par.* bei den Zahlen in noch höherem Grade der Fall. Die Normalien z. B. sind weit verstreut, fast von jedem Untersucher in wenigen Zahlen angeschnitten, noch unzureichend. Viele Befunde sind, so wertvoll sie sein mögen, unvergleichbar. Auf methodologischem Wege kann durch Parallelen vieles Bisherige konsolidiert, mindestens gedeutet werden.

Die Entwicklung der Methodik durchläuft die einfache (isolierende) Bestimmung, das Digitoninverfahren, die Entfaltung der Colorimetrie. Entscheidende Etappen sind getragen von den Namen Ritter, Windaus, Grigaut, Autenrieth, Weston, Iscovesco, Bloor, Müller, Gettler, Bernhard, Myers, Bang, ferner von Csonka, mit Angaben von Henes, Klein und Dinkin, von Weston, Feigl, von Luden, von Myers u. a. des näheren ausgestattet. Die erheblichen Abweichungen erstrecken sich, nach den Extremen der Werte, von denen nach Gerad und Gettler einerseits, zu denen nach Bloor andererseits.

Besondere Bedeutung verdienen die Angaben von Weston und von Müller sowie von Myers, die Aufnahme der Befunde, daß Gallensäuren in Form bestimmter Derivate bei der Cholestolprobe reagieren (Wieland und Weill, die von Klein, von Feigl, von Luden und Myers übernommen wurden. Letztere haben sich des näheren mit der Berücksichtigung dieser unspezifischen Interferenzen beschäftigt.

Die Bedeutung des Oxycholesterine, deren Grundlagen von Lifschütz gelegt wurden, ist für sich zu behandeln.

In der Cholesterinämie sind breitere angewandte Untersuchungen

fast ausschließlich auf die eigentlichen colorimetrischen Methoden verwiesen. Deren vorbereitende Isolierung weist darauf hin, daß man es zumeist nicht mit einer Abtrennung aller Begleiter zu tun hat. Unterschiede bestehen immerhin, je nach dem Charakter der Verarbeitung von Blut und Serum auf cholesterinhaltige Extrakte, ebenso je nach der Wahl des colorimetrischen Reaktionsprinzipes, das der Bestimmung zugrunde gelegt wird. Die störenden Faktoren sind für die Cholestolreaktion von Liebermann-Burchard, für die Probe von Salkowski, für die kompliziertere von Tschugajew nach Art und Menge verschieden zu beziffern. Es haben also Bestrebungen, alle drei Prinzipien zu (colorimetrischen) Analysen nebeneinander zu betätigen, eine aussichtsreiche Begründung. Die praktisch weniger bevorzugten Verfahren nach Iscovesco und nach Weston und Kent beanspruchen daher in den Augen der Methodologen ein gewisses Interesse, da sich häufig genug in der pathologischen Chemie (speziell des Blutes) gezeigt hat, daß aus den Abweichungen begründeter Werte bei spezifischen Analysen Schlüsse über Interferenzen sich ziehen lassen.

Diese Voraussetzungen darf man anerkennen für die übrigen Faktoren, welche bei den Methoden in Relation zu Abartungen blutchemischer Konstanten treten.

Unser Programm verlangt daher auch die Bearbeitung mancher Sonderaufgaben.

Vergleichende Methodologie¹⁾.

1. Verfahren der Aufarbeitung — Extraktion, Reinigung und Isolierung, Vorbehandlung.

1. Einfache Extraktion aus Trockenpräparaten (ältere Technik; Gettler und Baker, Myers, Bang).
2. Extraktion indifferenten Charakters aus nativem Blute (Weston und Kent, Bloor).

¹⁾ Die auf colorimetrischem Wege benutzten Reaktionen seien, soweit sie nicht in allgemein zugänglichen Arbeiten näher beschrieben sind, kurz skizziert.

Ältere Literatur bei W. Glikin, Biochem. Zentralbl. **7**, 1908 (Sammelreferat).

Die Schwefelsäure-Chloroformprobe nach Hager-Salkowski ist eine von mancherlei Erscheinungen abhängige Probe, deren Ausdeutung nicht streng möglich ist. Primäre Blutrot-, Kirschrot-, Purpurfärbungen von evtl. tagelanger Haltbarkeit lösen sich in Chloroform, während die unterschichtete Schwefelsäure grünlich fluoresciert. Farbänderungen über Blau—Grün—Gelb in der Schale. Beim Verdünnen mit Chloroform entschwindet die primäre Färbung momentan, um später über Blau wieder in die typischen Nuancen zurückzukehren. Man sucht das Verhalten im Wassergehalte des Chloroforms zu begründen (s. u.).

Diese Probe ist von Weston und Kent zu einer Reihenmethodik durchgebildet worden. (Lit.: E. Henes, Dtsch. Arch. f. klin. Med. **111**, 129. 1913.) Man findet die Detailvorschriften bei Henes, bei Weston und Kent (loc. cit.) und P. G. Weston (Journ. of Biolog. Chem. **28**, 385. 1916/17, weshalb hier von ihrer Wiedergabe Abstand genommen wird. Weston gibt in seiner Reihe 0,1—0,3 mg

3. Direkte Verseifung und Extraktion ohne Zwischenbehandlung (Autenrieth und Funk).
4. Direkte Verseifung mit anschließender Reinigung, dann Extraktion (Weston, Csonka).
5. Extraktion, Verseifung; anschließende Reinigung, Extraktion (Weston und Kent).

für 1,0 ccm Chloroform) auf reines, vom blassesten bis tiefen Rosa abgestimmtes Vorkommen der typischen Probe. Der Verlauf will gut beobachtet sein.

Henes äußerte ein ablehnendes Urteil (1913) („Menschenserum keine übereinstimmenden Befunde“), bald „schmutzigrosa“, bald „braunschattiert“ usw.

Weston behielt seine Methode bei (s. o.), Urteil s. im Texte.

Die Liebermann-Burchardsche Probe, auf die Beziehungen zu Cholesterin gegründet, ist von letzterem Autor technisch erstmalig durchforscht worden und für rund 0,05 g Ch. in Chloroform als geeignet zur Messung auf Grund der grünen Phase erklärt worden. Eine Durchbildung gelang ihm nicht.

Diese findet sich bei Autenrieth und Funk, bei Bloor u. a., bei Myers, Bernhard in colorimetrischen Vergleichsversuchen, wie auch (z. B. bei Grigaut) in Reihenversuchen. Einzelheiten siehe im Texte. Lit. zu Grigaut s. bei Henes.

Die δ -Methyfurol (Rhamose)probe von Neuberg und Rauchwerger kann als Ringprobe, auch in freier Lösung (Alkohol!), gehandhabt werden, gibt himbeerrote Töne, ist spektroskopisch definierbar und zeigt die Empfindlichkeit 0,002 g in 6,0 ccm Alkohol. Eigene Beobachtung s. Text.

Die von Tschugajew entworfene Probe ist äußerst empfindlich (1 : 80 000) und durchläuft technisch folgende Phasen: 1. Geeignete Menge Cholesterin (rd. 0,1 g) + 3,0 ccm Acetanhydrid + 2,0 ccm Acetylchlorid, dann + 1,0 g ZnCl_2 sicc. ansetzen. 2. 5 Min. im Wasserbade wärmen. Gegen entsprechender Vergleich messen. Diese Probe ist von Iscovesco eingeführt und empfohlen worden. Nach ihm ist die Cholesterolprobe abhängig von der Beleuchtung, der Schwefelsäuremenge, der begleitenden Belastung. Vorliegende sei zeitlich unabhängig, unempfindlicher, aber von Fettsäuren abhängig, doch in der Beleuchtungsfrage handlicher. Henes erklärte Beständigkeit für 48 Stunden, lehnte aber nach Defayes Urteil die Übernahme ab wegen 1. der technisch nötigen Zufügung des die Färbung vollenden Chlorides, welches unhandlich ist; 2. der gleichartigen Unhandlichkeit des ZnCl_2 , welches ebenso wasserfrei zu benutzen und abzuteilen ist; 3. der „Unproportionalität“; 4. der zu starken Farbbildung, der großen Verdünnungen und Reagensmengen.

Uns schienen alle Einwände nicht so schwer zu wiegen, wie von Henes betont, wenn schon die Technik umständlicher ist. Angaben s. im Texte. Lit.: E. Henes, Dtsch. Arch. f. klin. Med. **111**, 128. 1913. Defaye, La Cholestérinémie. Bordeaux 1911/12, Études cliniques Nr. 126. Iscovesco, Presse méd. 1908, 18. VII. und 19. bzw. 25. VIII. Tschugajew, Zeitschr. f. angew. Chemie 1900 (25).

Von den in der Aufstellung aufgeführten varianten Isolierungsmethoden dürften einige in weitere Publikationen eingegangen sein, so daß wir uns für vorliegenden Zweck der kürzesten Fassung bedienen können. Die im medizinischen Kreise geschätzte Autenriethsche Technik (Autenrieth und Funk, Münch. med. Wochenschr. **60**, 1243. 1913) ist in klinischen Blättern mehrfach wiederholt und in kritische Abhandlungen (P. G. Weston, Journ. of Biolog. Chem. **28**, 385. 1916/17 u. a.) übergegangen. Bloors Verfahren (W. R. Bloor, Journ. of Biolog. Chem. **24**. 1916; derselbe mit Knudson, ebenda 1917) ist in deutschen Arbeiten speziell von Joh. Feigl (1918—1920) behandelt worden (s. P. G. Weston, Luden, Myers). Die Methode von P. G. Weston und Kent (Journ. of med. res.

II. Verfahren der Bestimmung.

1. Digitoninmethode. Kenntnis ihrer Leistung, besonders in der Mikrochemie; ihre Einführung in das colorimetrische Verfahren.

26. 531. 1912) findet sich detailliert u. a. bei E. Henes, Dtsch. Arch. f. klin. Med. **111.** 1913; Proc. of the New York pathol. soc. **13,** 155. 1913; auch bei P. G. Weston, l. c. Sie beruht auf 1. völliger Erschöpfung einer Blutprobe mit 10 Vol. Alk. von 95% bei 60° unter Nachwaschen. 2. Gewinnung des Rückstandes, dessen Reinigung; Aufnahme des Chol. in Äther. 3. Hydrolyse mit KOH, Einengen. 3. Fällung mit wässerigem $\text{Ca}(\text{OH})_2$, dgl. Nachwaschen. 4. Trocknen, Ausziehen mit Chloroform. P. G. Weston gab 1916/17, l. c. folgende, nicht allgemein zugängliche Vorschrift: 1. Hydrolyse im Sinne von Autenrieth und Funk. 2. Einengung, Behandeln mit Kalkwasser, Gewinnung einer Fällung. 3. Aufnahme des Chol. in Chloroform. Ebenso ist die Methode von F. A. Csonka weniger bekannt geworden (Journ. of Biolog. Chem. **24,** 431. 1916): 1. 2,0 ccm Blut, 20,0 ccm Alkohol, 4,0 g KOH, 2,0 ccm 10 proz. BaCl_2 -Lösung in geeigneten Spezialkolben 1 Stunde unter Rückfluß kochen lassen. 2. Aufnahme in Äther, der streng alkalifrei gewaschen wird. 3. Ätherschicht, trocken, abdestillieren, 4. Rückstand in Chloroform aufnehmen. Ebenso wenig ist die Vorschrift von A. O. Gettler und W. Baker (Journ. of Biolog. Chem. **25,** 211. 1916) bekannt geworden. Feigl hat mehrfach zu den abwegigen Befunden Stellung genommen und auch speziell die Cholesterinzahlen, welche so relativ niedrig ausfallen (Gettler und Baker), abgelehnt. 1. 5,0 ccm Serum läßt man in ein loses Würfelchen Cellulosewatte oder Filtrierpapier (Blockstücke!) aus der Pipette vorsichtig einlaufen. 2. Man trocknet über P_2O_5 bei 55—60° C in vac. ca. 16 Stunden lang. 3. Man extrahiert fortlaufend zur Erschöpfung mit Äther. 4. Ätherrückstand wird in Chloroform gelöst. 4. P. G. Weston (1916/17) modifizierte zu Vergleichszwecken die Beendigung der Bloortechnik durch Verseifung nach Autenrieth - Csonka - Weston und kombinierte nach Weston und Kent.

Einzelne Züge der Bloorschen Technik gelangen zur Diskussion.

Die mikromethodische Digitoninfällung findet sich bei Bloor und Knudson (s. u.) und bei Bang (s. u.). Beide Techniken s. in Mitteilungen von Feigl.

Die Isolierungsmethode (zweistufige Extraktion) von J. Bang, s. später.

Das Bichromatreduktionsprinzip desselben Autors s. ebendort.

Den Versuch Feigls, den colorimetrischen Maßstab in der Größenordnung der Tropfenentnahme des Blutes (Stich — 100,0 mg bis 300,0 mg) zu betätigen s. u. a. später.

Das nephelometrische Prinzip von W. R. Bloor (Gesamtfett, d. i. nephelometrischer Wert der Fettsäuren + nephel. Wert des „Verseifbaren“ in einem Zuge gemessen) s. auch den Originaltext Bloors in den Arbeiten von J. Feigl, Biochem. Zeitschr. 1918—1920, Lipämieuntersuchungen I bis VI, speziell I, II, III. Dazu die Arbeiten von F. A. Csonka. Journ. Biol. Chem. 1918/1920.

Die späteren Vorschriften zur Bestimmung des Blutcholesterins (Bernhard, Myers) s. u.

Cholesterin, als Ausdruck des Coprosterins angesehen, zur Kotanalyse zu benutzen, hat Myers angeraten. Im gleichen Sinne haben wir die selbstverständlichen Maßnahmen (in Anlehnung an obige Techniken: Entfernung des Bilirubins usw.) schon seit 1917 regelmäßig erörtert.

Bezüglich der Organenanalyse darf auf die literarisch reiche, ältere Angaben mit umfassende Arbeit von Joh. Fex (Biochem. Zeitschr. 1920) hingewiesen werden.

Die ältere Literatur über Cholesterin usw. inkl. Methoden s. Biochem. Centralbl.

7. 1908, Sammelreferat von W. Glikin, Berlin.

2. Colorimetrische Methoden auf Grund der Cholestolreaktion von Liebermann - Burchard (Typen: Grigaut, Autenrieth, Funk, Bloor, Gettler und Baker, Myers).
 3. Desgleichen von Salkowski (Weston und Kent).
 4. Desgleichen von Tschugajew (Iscovesco).
 5. Cholestolreaktion der Ester. 6. Essigsäure-Schwefelsäurereaktion (Lifschütz).
- III. Vergleichende Untersuchungen über die verschiedenen Typen colorimetrischer Verfahren.
1. Vergleichende Untersuchungen zwischen Colorimetrien und dem Digitoninverfahren.
 2. Bewertung der einschlägigen Verfahren; Stellungnahme zur Frage praktischer Verwendung.
 3. Vergleichende Beurteilung von Interferenten, spez. bei der Cholestolreaktion.
 4. Beziehungen zwischen Isolierung und Bestimmung sowie zwischen Cholesterin und den reaktiven Interferenten.
- IV. Besondere Bestimmungsmethoden; spez. die Systeme von Ivar Bang und von W. R. Bloor.

Gegenwärtiger Stand der Methodologie.

Betrachtet man die Möglichkeiten für eine mikrochemische außerdem prompte und (zum mindesten für die praktische Arbeit) sichere sowie bei der Anwendung im fortlaufenden Dienste (d. h. auch in Reihenuntersuchungen, eventuell in der Hand technisch geschulter Kräfte) an sich geeignete Methodik der Bestimmung von (Gesamt-) Cholesterin in Körperflüssigkeiten (spez. Blut), so verengt sich der Kreis zunächst auf colorimetrisch brauchbare Reaktionen. Diese selbst beruhen der Hauptsache nach auf zwei Prinzipien. Das erste ist in Gestalt der Liebermann - Burchardschen Probe fast ausschließlich zur Herrschaft gelangt, für das einzelne Variationen in der Technik vorliegen. Es ist im Gebiete der colorimetrischen Analyse des Blutcholesterins u. a. von Grigaut, dann von Authenrieth und Funk, ferner von Bloor in den Originalmethoden dieser Autoren, ferner in anderweitigen Kombinationen (Isolierung) von Henes, Csonka, Bernhard, Myers u. a. benutzt worden. Die (ältere) Reaktion von Salkowski ist bes. von Weston als geeignete Technik für die einschlägigen Arbeiten erkannt worden. Die (im einzelnen schwierigere) Probe nach Tschugaefff hat Iscovesco mit guten Gründen, die aber auf äußere Schwierigkeiten stoßen, angewandt.

Auf die Eigenheiten dieser Reaktionen, ihren Charakter, ihre Anwendbarkeit und Handhabung gehen wir weiter unten ein. Sie wirken außerdem nicht nur durch sich selbst; man wird sagen, daß sie (d. h. in den Extrakten, auf die sie zur Anwendung kommen) nicht allein den Ausfall der Ergebnisse bestimmen. Das der Prüfung zu unterwerfende Cholesterin hat die Isolierungstechnik durchgemacht und ist nicht nur

nach seiner Menge, sondern durch seine Eigenschaften (Begleiter usw.) von jeweils besonderem Einflusse auf den Verlauf der Farbreaktionen mit den benutzten Reagenzien. Auch diese Fragen werden wir zu berücksichtigen haben.

Der wichtigste Schritt in der Aufklärung der Reichweite und Objektivität colorimetrischer Bestimmungen liegt in der vergleichenden Prüfung dieser gegen andere Verfahren durchaus heterogenen Charakters. Die Gravimetrie ist hier der nächste Weg. Sie fußt auf der Beobachtung von Windaus über die Digitonidbildung. Diese ist zwar nach und nach, besonders durch die Auffindung der Cholesterinoxydate (Lifschütz) in andere Beleuchtung gerückt worden, hat aber zu vielen Beobachtungen mit fast ausnahmslos gutem Erfolge gedient (s. u.). Andererseits ist, wie die umfangreiche Literatur (von Grigaut bis Bloor und Myers) erweist, die Colorimetrie verschiedenster Artungen reichlich und meistens mit gutem Erfolge in Anwendung gezogen worden. Soweit die immerhin doch recht begrenzten Unterlagen reichen, ist mit dem Ergebnis zu rechnen, daß die Colorimetrie nach Authenrieth - Funk, welche an sich (vergleichsweise) zu niederen Werten disponiert, um 10% die Zahlen der Gravimetrie überschreite. Nun gibt das in seinem einleitenden Teile (Isolierung) schonendere Verfahren von Bloor Werte, die noch höher sind und die in größeren Reihen Durchschnitt und Grenzen des Authenrieth - Funkschen ganz beträchtlich hinter sich lassen. Aus dieser Tatsache heraus ergab sich nicht nur ein Bedenken gegen die Gravimetrie, die an sich das objektivere Verfahren (unter allen Kautelen) darbieten mußte, sondern (viel ausgreifender) gegen die getrennte Bestimmung freien Cholesterins und seiner Ester. Überdies aber kann unter Umständen zugegeben werden (jedenfalls für den Ausgangspunkt der vergleichenden Methodologie unserer Aufgaben trifft das zu), daß man hier einstweilen zwei Unbekannte gegeneinander zu werten habe. Die Durchführung solcher Arbeiten ist, was die analytischen Handhabungen selbst angeht, darauf angewiesen, jedes einzelne Prinzip (der Isolierung und Bestimmung) für sich zu kritisieren.

Vergleichende Zahlen auf gravimetrischer und colorimetrischer Basis erzielt, liegen vor von Authenrieth und Funk (1913), die in einer Bestimmung praktisch gleiche Werte erhielten bei energischer Hydrolyse und Colorimetrie einerseits, durch Trocknen (Gips) und Ätherextraktion andererseits. Da Äther (u. a. nach Klein und Dinkin) als schlechtes Extraktionsmittel gilt, kann diese isolierte Angabe kaum alle Zweifel beheben. Csonka gibt (bei seiner Aufschlußtechnik, s. u.) einen gut übereinstimmenden Befund. Weston, der sich eingehend mit der Colorimetrie und ihrer Kritik beschäftigte, gab eine Zahl an (künstlicher Zuschlag zu Blut), die in seiner Methodik zu hoch aufseiten der

Gravimetrie ausfiel. J. Howard Mueller, der die einschlägigen Aufgaben (1916) in Angriff nahm, führte Nachprüfungen der Digitoninfällungsmethodik durch, bei denen sich ausgezeichnete Werte — mit reinem Cholesterin — ergaben. Es wurde in heißem Alkohol mit 1 proz. Digitoninlösung (in 90 proz. Alk. bei 25% Überschuß des D.) gefällt, nach 24stündigem Stehen im Eisschrank, im Goochtiiegel nach Windaus gesammelt. Mueller lehnt sich ferner an eine Modifikation an, die Fraser und Gardner der Originalmethode verliehen. Das Kupplungsprodukt ist wenig löslich in Alkohol; die Waschung bringt unter Umständen Verluste. Heißes Wasser löst ersteres nicht, aber ist günstig zur Entfernung von eventuellem Digitoninüberschuß. Die Technik nach Fraser und Gardner (Ersatz des Goochtiiegels durch gehärtete Filter) wird bevorzugt und praktisch durchaus (von Mueller) als leistungsfähig erkannt. Der alte Faktor (0,25) von Windaus wird durch den berechneten (0,2431) ersetzt. Immerhin fielen die Kontrollanalysen beider Modifikationen gleich gut aus (womit an sich nichts gegen die größere Brauchbarkeit der Ausführung für praktische Massenarbeit gesagt sein soll). Danach ist also die Gravimetrie durchaus stichhaltig, solange es sich um reines Cholesterin handelt. Die (mikrochemische) Spezialtechnik der Digitoninfällung nach Bloor wird uns noch beschäftigen, dgl. die Angaben von Bang und von Myers.

Was nun die Colorimetrie angeht, so handelt es sich zunächst um die Handhabung und das Verhalten der einschlägigen Methoden in reinen Lösungen. Sieht man von den prinzipiellen Fehlerquellen der Colorimetrie überhaupt ab, die im großen ganzen zur Zeit durch weite Anwendung und Schulung gemildert sein dürften, deren starke subjektive Ausschläge zu umgehen sind (Eignung des Untersuchers), die endlich durch die Prüfung und Charakterisierung zahlreicher Verfahren zur Diskussion gestellt und zum Teil befriedigend geklärt wurden, so läßt sich sagen, daß die eigentliche, stabile Phase der Liebermann-Burchardschen Reaktion an sich sehr günstige Vorbedingungen schafft. Sie ist zur Zeit fast ausschließlich im Gebrauch; daher ist ihre Kenntnis wichtiger als die der übrigen Proben (s. o.). Speziell zwischen 1,0 mg und 4,0 mg Cholesterin ist sie sehr günstig (Mueller), doch auch hinab auf 0,3 mg und 0,5 mg brauchbar, hinauf bis etwa 5,0 mg (Feigl). Niedrige Grade sind nicht so leicht zu handhaben, weshalb Mueller vorschlägt, den Gesamtextrakt von 2,0 ccm Blut der Reaktion zu unterwerfen und aufs Colorimeter zu bringen; dies sei unter Umständen tunlicher, als nach der Verdünnung auf 100 ccm 5,0 oder 10,0 ccm zu benutzen. Wir können dem nicht ganz zustimmen, da bei den leider nicht durchaus vermeidlichen Mängeln die Farbstörung zuzeiten überwältigend werden kann. Es handelt sich bei der Besprechung methodischer Versuche der Colorimetrie an sich (losgelöst von der Isolierung, ihren Begleit-

erscheinungen, den tatsächlichen und gelegentlichen Interferenzen der Reaktion) um die Prüfung der Erscheinungen im Kreise reiner Substanzen, d. h. hier zunächst des Cholesterins selber. Die Bestimmung ist im Laufe der Jahre fast ausschließlich auf das Prinzip der Liebermann-Burchardschen Reaktion übergegangen, die von Grigaut für die Blutanalyse zugeschnitten wurde, und die (mit einzelnen Variationen — trotz der besonders von Iscovesco hervorgehobenen Mängel — s. u.) von Henes, Authenrieth und Funk, Csonka, Bloor, Gettler und Baker sowie den zahlreichen Forschern an Hand der vorgeschlagenen Methoden benutzt worden ist, wobei sie ganz entschiedenes Übergewicht gegen die Salkowskische Probe (Weston und Kent, Schmidt und gegen die von Tschugaeff (Iscovesco) zeigt. Das Nähere beschäftigt uns weiter unten.

Über die Natur und Entwicklung der zur Colorimetrie recht brauchbaren grünen Phase dieser Reaktion haben sich die verschiedenen Untersucher ausgesprochen. Ziemlich allgemein ist das Urteil, daß man es mit einer empfindlichen, manchen an sich geringfügigen Störungen ausgesetzten Reaktion zu tun habe. Das ist einer der Gründe, weshalb trotz ihrer Einfachheit von verschiedenen Seiten Bedenken geäußert wurden und weshalb selbst eine in technischer Beziehung weit unangenehmere Prüfung (Iscovesco) empfohlen wurde. Gelingt es nun, dem Momente der Farbentwicklung zu Vergleichszwecken gerecht zu werden (was auf verschiedenen Wegen erstrebt wurde) und setzt man diese Aufgabe als gelöst voraus, so ist der eigentümliche grüne Ton für die Colorimetrie geeignet. Henes urteilte, an die derzeitigen Stimmen in älteren Arbeiten anknüpfend, „daß diese Bestimmungsmethodik an sich sehr gut brauchbar sei, und daß Nichtübereinstimmungen, wenn nicht immer, so doch hauptsächlich auf technischen Fehlern oder unreinen Gläsern beruhen“. So einfach liegt die Sache keinesfalls, wie sich seither wiederholt gezeigt hat, wenn es sich um Blutextrakte handelt; ja nicht einmal bei Prüfung reiner Lösungen kann von grundsätzlichem Ausschlusse schwerer Strömungen gesprochen werden. Iscovesco wendete ein, daß die Liebermann-Burchardsche Probe weitgehend von Beleuchtung usw. abhängt. Dieser Einwand kann nicht durchschlagend genannt werden, wenn schon nach unseren Erfahrungen auffällig große Einflüsse zuzugeben sind. Mit der Anerkennung und Vermeidung von Störungen colorimetrischer Arbeiten durch wechselnde Beleuchtung hat man sich in der jüngsten Zeit viel beschäftigen müssen, seit Kreatinin, Harnsäure, Aceton, Ammoniak, Aminosäuren (durch Ninhydrin) usw. mikrochemisch bestimmt werden. Für den Ausgleich dieses Fehlers gibt es Möglichkeiten genug (besonders künstliche Beleuchtung, die Bloor speziell für die einschlägige Ermittlung des Cholesterins empfahl). Ferner sei der Zusatz von Schwefelsäure je nach den Mengen von Einfluß, — das stimmt.

Diesem Mangel ist weitgehende Aufmerksamkeit geschenkt worden; in allen neueren Methoden (Authenrieth, Bloor) ist die Angabe: 3 Tropfen durch die Forderung genau gemessener Mengen (0,1 ccm, was sich durchaus befriedigend machen läßt) ersetzt.

Dagegen ist der letzte Grund gegen die Reaktion von Liebermann-Burchard durchaus richtig vorgebracht und (besonders für Blut-extrakte, wie unten zu zeigen sein wird) schwerwiegend. Er bedenkt die Variationen „durch Unreinheiten“. Fehler durch solche können in drei Richtungen liegen. Es kann sich bei (Blut- usw.) Extrakten um Körper handeln, die dem Cholesterin nahestehen (Oxycholesterin, Polyoxydate, Lifschütz), die gleiche oder ähnliche Farbreaktionen geben. Sie können sowohl präformiert sein (was jetzt gesichert gelten muß, Lifschütz, Schreiber), wie auch vielleicht im Verlaufe der Vorbereitung (vgl. den Versuch über Oxydation von Cholesterin durch Trockenblut, Lifschütz: Hydrolyse, Extraktion usw.) entstehen. Zu dieser Stellung zu nehmen, ist eine wichtige Aufgabe der mikrochemischen Methodologie des Cholesterins von Blut und Organsubstanz. Ferner ist wiederholt, und zwar in streng differenten Arbeitsverfahren darauf hingewiesen worden, daß bei der Spaltung, Trocknung usw. Stoffe irgendwelcher Art (nichtsterinartigen Charakters, sondern „Verunreinigungen unspezifischer Natur“) entstehen, die die Farbnuance, Farbintensität und Farbentwicklung so weit stören, daß besondere Kunstgriffe nötig sind (s. u.), bzw. daß die sonst vollauf befriedigenden Methoden zu glatten Versagern in der Colorimetrie führen. Endlich sind es die in der Literatur als „Unreinlichkeit“ schlechthin (Iscovesco, Mueller) bezeichneten Störungen der empfindlichen Reaktion, die den Gläsern usw. anhaften sollen. Sie spielen sicher eine große Rolle und greifen selbst in die Genauigkeit der Arbeit mit reinen Lösungen ein.

Mueller, der schließlich in seinen kritischen Beobachtungen zu dem (befriedigend belegten) Schlusse gelangte, daß „sowohl Gravimetrie wie Colorimetrie“ bei richtiger Handhabung (in reiner Lösung) exakte Werte geben“, berichtet über Versuche, in denen mit reinstem Cholesterin die objektiven Fehler der Colorimetrie geprüft werden sollten. Im Dubosq ergeben sich vier genaueste Übereinstimmungen (6,0 bis 24,0 mg), darunter ohne jeden Anhalt ein Versager mit an 20% Fehler. Die Tatsache, daß der Autor darüber berichtet, ist erhärtet durch die Bedeutung des Befundes, durch die sicher häufiger beobachtete Erscheinung und durch die „Unerklärlichkeit“.

Die also in der Methodologie sowie auch in Äußerungen praktischer Anwendung wiederkehrende Angabe bzgl. der Empfindlichkeit gegen sogenannte „Unreinlichkeit“ hat Mueller bei kritischen Versuchen an reinen Lösungen beobachtet. Die Erscheinungen in Blut- und Organ-

extrahen müssen uns später beschäftigen, da sie zu weiteren Bedenken geführt haben. Wir haben seit 1914 mit allen einschlägigen Modifikationen der Cholesterincolorimetrie gearbeitet und können zwar im Prinzip die Möglichkeit auffallender Störungen auch in reinen Lösungen einräumen. Indes ist die sogenannte Empfindlichkeit rein methodisch betrachtet, kein Faktor, der vor kritischer Arbeit mit Reagenzien und Geräten bestehen bleibt. Er hat, besonders seit dem Umsichgreifen der Analysentätigkeit wenig Geschulter, sicher eine beachtliche Rolle gespielt, wie unsere Erfahrungen beweisen. Zu den Fehlerquellen gehört vor allem auch das Chloroform. Kriegspräparate (dazu z. B. Schwefelsäure) sind sorgfältig zu prüfen. Acetanhydrid kann Nebenprodukte enthalten. Das Glasinventar, die Kolben zum Auffüllen der Chloroformextrakte und die kleinen (mit Marken versehenen, Schliffstopfen tragenden, dickwandigen) Reagensgläser für die Prüfung an sich, seien stets für diese Arbeit ausschließlich reserviert. Schon in reinen Lösungen kann der Farbton derartig abweichen, daß (entgegen manchen günstigeren Urteilen) von einer ernsthaften Farbvergleichung, erst recht von einer Messung gegen einen beliebigen Standard (nach Nuanze und Intensität) keine Rede sein kann. Diese „Versager“ müssen natürlich unter üblichen Vorbedingungen der Anwendung bedeutend größer werden.

Bei der Betrachtung halten wir uns zunächst an die Isolierungstechniken, die darauf ausgehen, durch energische Hydrolyse das gesamte Cholesterin unter sicherer Spaltung des Esteranteiles vollkommen frei zur Extraktion, nach ihr zur Reaktion und zur Messung zu bringen. Authenrieth und Funk haben in der „Chloroformmethode“ die direkte Aufarbeitung gegeben. Sie berichten, und mit ihnen eigentlich alle Nachuntersucher, daß häufiger eine grüne Färbung entsteht mit mehr oder minder erheblicher „Beimengung von Braun oder Gelb“. Sie berücksichtigen diese, u. E. für die Praxis viel zu günstig beurteilte Tatsache und meinen, daß schließliche „Versager“ selten seien, indem eine schwere Beeinträchtigung der Ablesung gegen den Keil meistens nicht in Frage käme. Müller sagt, daß „das Verhalten eigentlich selten sei“. Man geht allgemein von der Meinung aus, daß es sekundäre Produkte aus der Verarbeitung des Serumhydrolysats seien. In dieser Hinsicht muß man Unterschiede gelten lassen. Wir haben z. B. in einer ad hoc gesammelten Arbeitsreihe von Bestimmungen im Vollblut bzw. im Serum auf 8—2 solcher „gelblichen und bräunlichen“ Nuancierungen gesehen. Dabei ist also die Häufigkeit ihres Auftretens bei Anwesenheit von Hämoglobin größer. Von den Ausfällen haben wir — um jeder bedenklichen Deutelei, dem gewollten „Retten“ von Analysen, was mehrfach vorliegt, aus dem Wege zu gehen — die Hälfte durchaus verworfen, bei den Serumfällen war dies nicht nötig. D. h. also, es waren im erste-

ren Falle 3% absolute Versager, an 8% wenig befriedigende Ausfälle, im letzteren keine. Diese Reihe ist nicht zufällig gewertet; es liegen andere mit ähnlichen Zahlen vor, bei denen überdies der Keil mit dem „permanenten Standard“ durch Stammlösungen (Grigaut, Weston-Kent, Bloor, Mueller u. a.) und die Messung im Dubosq ersetzt wurde. Die Frage der Farbentwicklung gegen einen fixen Standard an Stelle eines der Herausbildung fähigen berühren wir noch. Authenrieth und Funk haben diese Erscheinung fremder Nuancen und die Versuche zur Vermeidung beschrieben. Es kommt darauf an, eine gründliche Trennung von Chloroform und Hydrolysat zu erzielen. Bei richtiger Technik muß das durchführbar sein. Findet sich, was unter Umständen passieren kann, ein feines schlammiges Sediment an der Grenzschicht, so kann man die einzelnen Extraktionsanteile in weitem Scheidetrichter sammeln, dort absitzen lassen und später trennen. Jedenfalls müssen Alkali und Spuren des feinen Schlammes, endlich auch gewisse Sekundärprodukte (Isonitrilgeruch s. u.!) wegen der färbenden oder farbstörenden Eigenschaften entfernt sein. Authenrieth und Funk sowie Nachuntersucher sagen, daß die (ebenso notwendige) Trocknung des Extraktes, mit der Entwässerung und Klärung vereint, durch wasserfreies Natriumsulfat erzielt werden könne, wobei die nachträgliche Nuancierung des Grüns fortfalle. Das ist bei sorgfältiger Handhabung aller Einzelmaßnahmen zumeist richtig. Immer gelingt das nicht; die Ursache kann Alkaligehalt sein. Mueller, der von der einfachen Natriumsulfatklärung nicht befriedigt zu sein scheint, empfiehlt, die vereinten Chloroformanteile der Ausschüttelung mit wenig Wasser zu waschen, wobei schnell ein ungefärbtes Extrakt (sogar ein solches, das die nachträgliche Farbstörung nicht zeigt) entstände, dann zu trocknen. Ähnlich arbeitet — trotz der Vorbehandlung Csonka (s. o.).

Es ist nunmehr die Frage, ob diese Neigung zum Auftreten bräunlich abgearteter Reaktion (und der Versager) nur mit der energischen alkalischen Hydrolyse verknüpft ist, oder ob auch andere Verfahren Ähnliches zeigen. Das Ziel der ersteren ist die Gewinnung des Cholesterins in freier Form in tunlichster Reinheit; es verzichtet also auf die Erfüllung der Aufgabe, Cholesterin im präformierten Zustande objektiv darzustellen. Es zielt auf grundsätzliche Verseifung des Esteranteils, wobei naturgemäß eine wichtige, schon vor der Einführung der colorimetrischen Mikroanalyse, zum Teil durchgeführte Aufgabe (Bürger und Beumer) großen Wertes in der Pathochemie verlorengeht. Diese selbst kann nur durch schonende Extraktion bewirkt werden, welche in Anlehnung an entsprechende Grundlagen von Bloor (s. u.) in günstige Form für vorliegende Frage gebracht wurde. Csonka hat (s. u.) zur Klärung Bariumchlorid der Aufschlußmischung beigelegt (Spezialtechnik) und berichtet über gute Erfolge und farbfreie bzw. nicht farb-

störende Extrakte. Weston und Kent gingen von der Alkoholextraktion (usw., s. u.) aus, der die Verseifung und die Fällung mit wässerigem Kalkhydrat folgte. Dabei reduziert sich unter umständlicher Arbeitsweise (die übrigens auch für die Beschreibung des präformierten Zustandes geeignet sein würde) die Möglichkeit trübender Extrakte usw. sehr, wie wir fanden. Weston verseifte später (s. u.) nach Authenrieth und führt schließlich die Kalkfällung aus. Hierbei ist, wie wir speziell untersuchten, unter gewisser Verlängerung der Arbeit die obige Störung ziemlich sicher zu umgehen. Die Beurteilung dieser abgewandelten Techniken kann nicht allein unter dem Gesichtspunkte „reiner Farberzeugung“ erfolgen; es gehört viel mehr dazu, die Promptheit, Einfachheit und die Rücksicht auf weitere mögliche Fehlerquellen (im Hinblick auf die Durchführung betriebsmäßiger Reihenuntersuchung; technisches Personal). Es kommt eine neue Extraktion hinzu, Filtration usw.!

Die reine Extraktionstechnik nativen (trocknen) Serums ohne Aufspaltung usw. bietet zwar relativ wenig sekundäre Produkte und läßt besonders die Entstehung von Stoffen aus teilweise zerstörten Derivaten des Cholesterins (die tunlichst als solche zu bestimmen wären!) kaum zu. Sie kann also zur Trennung der Esterfraktion durch Digitonin dienen. Sie enthält Fettsäuren, Lecithin, Farbstoffe (Bilirubin, Urobilin usw.), die zu Zeiten zu umständlicher Verarbeitung drängen und die gewisse Reaktionen an sich ausschließen, und dauert lange, ohne die Gewähr völliger Sicherheit zu bieten. Bloor, dessen Methoden (s. u.) einen Widerstreit der Meinungen hervorriefen, hat eine Extraktion beschrieben, die Feigl in zahlreichen Untersuchungen (s. u. bei speziellen Arbeiten), und die Mueller in seiner Methodologie als prompt, sicher, schonend, quantitativ charakterisierte (s. u.). Sie muß dieselben Stoffe des Serums aufnehmen, wie die Gettlersche Technik, steht jedoch (s. u.) gegen Farbstoffe besser da. Der Wert liegt in der schnellen und gut begründeten Wirkung, muß auch in der Vielseitigkeit dieser Vorbereitung zu den speziellen Einzelanalysen erblickt werden, die das Bloorsche System enthält (methodologische und praktische Ergebnisse Feigls). Das Extrakt eignet sich zur mikrochemischen Digitoninfällung und ist darum von hohem Werte. Bloor findet Cholesterinzahlen (s. u.), die beträchtlich über den gravimetrischen und denen der Hydrolyse und Colorimetrie (Authenrieth, Weston) liegen. An diesem Punkte setzt die Kritik der Cholesterinbestimmung nach Bloor an, an der sich Feigl, Mueller, Weston, Myers u. a. beteiligten.

Ersterer fand, daß die Abweichung gegen die niederen Werte keiner bloßen „Störung durch absolut fremde Stoffe“ entspringe, ferner, daß dieser Unterschied in Prozenten bei pathochemischen Fällen weitgehenden Abartungen unterliegen kann, bei gleichhohem Gesamtcholesterin, son-

dern daß auch häufig bei steigendem Gesamtcholesterin die prozentische Abweichung zwischen Gravimetrie (und Colorimetrie nach A u t h e n r i e t h und F u n k sowie nach W e s t o n) und Methodik von Bloor ganz erheblich fiel. Es müssen also höchstwahrscheinlich (vielleicht neben allfälligen Störungen usw.) andere Stoffe sein, die wie Cholesterin reagieren, dessen Farbreaktion steigern, ohne durch die Gravimetrie identisch erfaßt zu werden und ohne den hydrolytischen Einflüssen, denen Cholesterin fast ganz unbeschadet (s. jedoch Bloor), standhält, im selben Grade zu widerstehen.

W e s t o n, der lediglich die Kritik der Farbstoffbildung im Auge hatte, sagte, daß dieser Mehrertrag an Farbbildung in Bloorextrakten an sich zu Recht bestände, was auch F e i g l vielseitig belegte, daß aber dieses Plus nichts mit dem eigentlichen Cholesterin zu tun habe. Es müssen also, wie Bloor will, Anteile des Cholesterins selbst oder mindestens dessen nächste Verwandte, die die objektive Extraktion erhält, durch die Hydrolyse zugrunde gehen. Man muß diesem Einwand a priori beistimmen, da ja das „Zugrundegehende“ eine allfällig unbekannte Größe sein muß, deren Bedeutung uns besonders L i f s c h ü t z s ausgreifende Arbeiten darlegen.

Nun ist aber von M u e l l e r, nachdrücklich jedoch auch von W e s t o n gegen die Methodik von Bloor ein verständlicher Einwand, auf den man gelegentlich bei Arbeiten mit der betreffenden Methodik stoßen muß, erhoben worden. M u e l l e r bekämpft das Eindunsten des Originalextrakts, dessen vorsichtige (!) Behandlung schon Bloor nahelegte. Oft lasse sich eine leichte Bräunung geradezu nicht umgehen. W e s t o n, der Bloors Methodik inkonstante Werte nachsagt, fügte eine Verseifung ein (die nicht einmal förderlich ist), er lehnt das Verfahren an sich („useless“) ab. Er führt auch M u e l l e r an, um es zu diskreditieren, da die Bräunung der Extrakte zu weitgehend sei („in 80 Extrakten keiner frei von Verfärbung irgendeines Grades“). Wir halten diesem Urteile unsere Erfahrungen entgegen, die zwar anfänglich auch auf Schwierigkeiten stießen.

Übrigens spitzt sich in einer späteren Untersuchung von Bloor (mit K n u d s o n), die den mikrochemischen Ausbau der Digitoninmethode und kritische Beleuchtung der M u e l l e r s c h e n Darlegung über die Abweichungen von Gravimetrie und Colorimetrie zum Gegenstande hat, die Angelegenheit der relativ hohen Zahlen Bloors (des Mehrertrags von Farbstoffbildung in Originalextrakten) sehr in der Richtung auf die vorausgesetzten Oxydate zu. Da M u e l l e r annimmt, daß die dem Cholesterin nahen Stoffe die Farbreaktion, nicht aber (oder modifiziert in der Isolierung) die Digitoninfällung geben, so träfe die gravimetrische Methode mehr zu. Die Fällung der Oxydate, speziell des Oxycholesterins brauche eventuell nur eine teilweise zu sein. Dazu sei gesagt, daß die

Extraktion nach Bloor (auch nach Müller und Feigl) zureichend sein kann. Man darf sich unter Rücksicht auf eine partiell zerstörende Wirkung der Alkalihydrolyse (Authenrieth, Weston) über die relativ hohen Werte nach Bloor nicht wundern (s. jedoch Myers). Wenn man die Sache, auch angesichts der neusten Ergebnisse von Lifschütz richtig beachtet, so ergibt sich unseres Erachtens eine Lage, die dem Begriffe der Gesamtreduktion in der Blutzuckerfrage ähnlich genannt werden kann. Die schonendste Methode muß *et. par.* bei sonst genügend gekannter Leistung, die nach Feigl wohl sehr gut durch extrem pathochemische Verhältnisse bestimmt würde, die höchste Summe an Cholesterin und unmittelbaren Derivaten (eventuell auch sonst ähnlich reagierende Körper) geben. Es ist dann lediglich Sache der ferneren Methodik, dafür zu sorgen, daß die Erscheinungen der Farbreaktionen frei von den störenden Nebenvorgängen sind, die die Möglichkeit der Colorimetrie beengen (wie eine mehrjährige Aussprache in der Spezialliteratur gelehrt hat) und zum großen Teile entwerten. Daß selbst erfahrene Forscher mit dem Bloorschen Verfahren Schwierigkeiten fanden, haben wir gesehen. Diesen halten wir entgegen, daß man oft ohne solche auskommen kann, und daß dann die Technik befriedigend ist. Übrigens hat später (s. u.) auch Denis gute Erfolge erzielt. Der zweite Schritt in der Frage der Aufklärung der vorauszusetzenden Gesamtgröße mußte dann derjenige sein, das nicht eigentliche (echte) Cholesterin in tunlichst objektiven Werten herauszuschälen.

Inwieweit die Methoden Authenrieth - Funk bzw. Weston bzw. Csonka (auch in mikrochemischen Maßstäben) stichhaltig sind, ist noch zu untersuchen, wobei jedoch des Bloorschen Einwandes partieller Zerstörung zu gedenken sein wird. Bloor selbst schließt (mit Knudson 1916, Okt.) die Diskussion des Oxycholesterins noch aus der einschlägigen Frage aus, da die Grundlagen zu wenig geklärt seien.

Dagegen berührt er einen wichtigen Punkt, der nochmals (s. u.) zur Polemik führte. Da die Oxydate nicht (bzw. nur untergeordnet in der Fällung durch Digitonin; „Ätherlöslichkeit“) erhalten sind, so vermehren sie durch ihre Fähigkeit, den Liebermann-Burchard typisch oder dem echten ähnlich zu geben, den Betrag auf seiten der nicht fällbaren Anteile, d. i. der Cholesterinester, die also evtl. dadurch erhöht erscheinen könnten. Die pathochemische Bedeutung dieses Verhaltens leuchtet ein, besonders aber die (evtl. nachträgliche) Oxydation des Cholesterins (nach Vorstellung von Lifschütz). Der letztere Fehler (Feigl) muß im Plasma an sich wohl geringer sein. Relativ würde dann gleichzeitig das freie Cholesterin einem Rückgang unterliegen. Es ist klar, daß dieses Verhalten der Reststoffe des Gesamtcholesterins zu weiteren Überlegungen führen muß, die zuseiten von ausgreifenderem Einflusse sein werden.

Bloor stützte sich auf einzelne Zahlen von normalem Plasma und gelangte zu folgender Auffassung, der wir von vornherein nicht gänzlich beipflichten konnten. Er meint, daß in Wirklichkeit das Gegenteil von dem erschlossenen Zusammenspiel durch die Interferenz der Oxydate erzielt worden sei. Die Werte für freies Cholesterin seien in seiner vorliegenden (1916) und einer späteren Mitteilung

(1917, mit Knudson, 11) höher als die sonst in der Literatur niedergelegten. Daher seien die von Mueller auf Grund der einschlägigen Arbeiten angenommenen Stoffe entweder an sich nicht vorhanden, oder sie verhalten sich in der Digitoninmethodik geradezu wie das eigentliche Cholesterin. M. E. wird die von Mueller bevorzugte Modifikation der Originalmethode von Windaus (siehe Fraser und Gardner) diese Voraussetzung rein analytisch stützen können. Bloor verteidigt dann mit guten theoretischen und praktischen Gründen die mikrochemische Bestimmung des Blutcholesterins und ihre anerkanntermaßen relativ hohen Werte.

Auf die vorliegende Frage, die wir lediglich vom methodenkritischen Standpunkte der Grundlagen der Colorimetrie nach Liebermann-Burchard abhandeln, kam Müller (1917) noch einmal zurück, indem er die Darlegung von Bloor und Knudson einer Revision unterzog.

In exakten Löslichkeitsbestimmungen des Cholesterindigitonids in Äther, auf deren Beurteilung ja letzten Endes die Frage der relativ hohen colorimetrischen Wertausdrücke sich zugespitzt hatte, führte Mueller seine Vorprüfung durch. Sein Ergebnis, z. B. bez. auf 0,01 g Cholesterin (= 0,04 Digitonid) kann bestenfalls 3% zu niedrig (für Gesamtcholesterinzahlen) werden. Dabei würden also — (in reinen Lösungen, ohne Einschluß der Oxydate!) — die Zahlen nach der colorimetrischen Bestimmung von Bloor immer noch um rund 45% zu hoch ausfallen. Ohne die Bedeutung dieser Argumente zu beeinträchtigen, können wir uns doch mit der Betrachtung von Mueller, sobald sie auf die Verhältnisse des Blutes und der schon durch Extraktion erzielten Gesamtcholesterinfraktion übertragen sind, übereinwissen. Im übrigen müssen wir auf diese Frage bei der Methodik des freien Cholesterins noch einmal zurückkommen.

Gehen wir nunmehr auf die Handhabung der colorimetrischen Bestimmung in reiner Lösung ein, so haben wir dies oben erwähnte Moment der Farbentwicklung zu würdigen. Der Vorgang der Reaktion wird durch Acetanhydrid beschleunigt, durchläuft die Zwischenfarben und erreicht bei der zur Bestimmung gewählten Menge (s. o.) in ca. 15 Min. die relativ stabile Phase des reinen Grün. Seine Erzielung wird im Dunkeln gesichert.

Autenrieth nimmt die Reaktion bei 35° vor, was sich als sehr vorteilhaft für die Einheitlichkeit der Färbungen mit varianten Mengen erwies. Das Grün selbst ist, wenn einmal erzielt, Intensitätsschwankungen unterworfen, die ein Abblässen in ca. 1/2 Stunde, einen Übergang in schmutziges Olivergrün und erdliche Blässe mit sich bringen. Früher und jetzt benutzen die besten Methoden (Grigaut, Csonka, Gettler und Baker, Autenrieth und Funk, Bloor) geeignete Vergleichslösungen, die jeweils hergestellt und geprüft werden (s. u.). Henes strebte seinerzeit als erster in der Reihe der mit ihrer Anwendung beschäftigten Untersucher nach einem permanenten Standard in Gestalt eines Keiles für das Colorimeter von Autenrieth und Koenigsberger. Bestrebungen dieser Art gehören zum Zuge der Zeit und erfreuen sich weitgehender Wertschätzung bei Praktikern in Deutschland; sie sind sicher zum Teile berechtigt. Führende Methodologen und mehr exakt laboratoriumsmäßige Untersucher, spez. die amerikanische Schule, bevorzugen mit größtem Rechte die Stammlösungen und ihre parallele Verarbeitung. Wir dürfen hier mit Nachdruck auf Erfahrungen bei anderen colorimetrischen Analysen hinweisen und das Entwicklungsmoment mehr als bisher betonen. Für Kreatinin, Harnsäure, Aceton, Zucker usw. haben wir seit Jahren entsprechende Versuche angestellt. Gerade die Kreatininfrage (Bestim-

mung im Blute) hat durch die schwere Kontroverse, in der sie ihre Realität zu belegen hatte (Feigl), den Beweis geliefert, daß das Moment der Farbentwicklung gebührend zu berücksichtigen sei. Allerdings spielt bei ihr die relative Beteiligung der eigentlichen Kreatininreduktion im Rahmen der Eigenfarbe des Pikrates eine ganz hervorragende und nach ersten Erörterungen nunmehr erdęültig geklärte Rolle. Indes ist die Folge der betr. Störungen von dem Ausgangspunkte durch die zur Messung herangezogene relativ stabilere Hauptphase hindurch, über deren Abblassen und Vergehen eine viel gedrängtere bei der Reaktion des Cholesterins nach Liebermann - Burchard.

Die Unterschiede zwischen dem Verlaufe mit stärkeren oder schwächeren Cholesterinmengen sind gerade in der Geschwindigkeit und unter der Entwicklung hier weit größere. Ob, und eventuell wie weit, sie zu einer Bedeutung in grob praktischen Verhältnissen gedeihen, das ist eine Sache für sich, und das kann nur nach tatsächlichen Befunden in exakt laboratoriumsmäßiger gegen die diagnostisch-klinische Genauigkeit abgewogen werden.

Von Wichtigkeit ist das Moment auf jeden Fall; es fragt sich nur, wie weit ihm ein Einfluß auf das eigentliche Anwendungsgebiet zuzumessen ist. Hierüber fehlt es an Anhalten, die sicher durch das Allgemeinot der prompten Colorimetrie geradezu in ihrer Wertschätzung verrachlässigt worden sind, obgleich der gewichtigere Teil der Untersucher das stabile Maß nicht in Benutzung zieht. Folin hat bei seinen Bemühungen um die Ausgestaltung der von ihm (1904) eingeführten Kreatinincolorimetrie schließlich Mittel und Wege (die später von S. R. Benedict verbessert wurden) gefunden, Kreatinin in hardlichen Verfahren rein darzustellen. Dabei teilte er (1914) die Methodik mit farbentwickelnden Kreatinivergleichslösungen mit und betonte, daß das Gegenteil zu einer unerwünschten (und unter Umständen schädlichen) Beengung eines an sich so vielseitigen Verfahrens führen müsse. Das Urteil von Myers s. u. Für Cholesterinanalysen kann man Folins Ausführungen uneingeschränkt unterstreichen, wenn man exakt laboratoriumsmäßige Arbeit im Auge hat.

Fahren wir nunmehr in der Erörterung der Beziehung von Gravimetrie und Colorimetrie fort, so ist die Frage zu lösen, ob die Extraktionsmethoden an sich die völlige Gewinnung von Cholesterin gewährleisten. Die Technik nach Shimidzu, Weston - Kent und nach Bloor leistet dies, wie von Müller nachgewiesen, später von Myers in etwa bezweifelt wurde. Unsere Erfahrungen zeigen, daß der Modus von Gettler und Baker nicht immer erfolgreich ist, weshalb wir die betreffenden Zahlen an sich in Zweifel zu ziehen geneigt waren (ca. 60 mg für 100 ccm Plasma). Auch bei völliger Extraktion ist das Übergewicht der Colorimetrie ein erhebliches.

(Bloor z. B. 267,0 mg gegen Autenrieth 231,0 mg gegen 169,0 mg Gravimetrie usw.). Die Extraktion hinterließ im erschöpften Rückstande bei Hydrolyse nach Autenrieth auf 20,0 mg Blut nur 0,1 mg Gesamtcholesterin (völlige Extraktion!). Obiges Zahlenverhältnis bleibt auch in Organen erhalten. Es ergibt sich nun die Aufgabe über den Gedankengang Bloors, Cholesterin selbst werde im Verlauf der Hydrolyse (nach Autenrieth) teilweise zerstört, etwas auszusagen. Mueller ist geneigt, diese an sich plausible und für die Erklärung der strittigen Verhältnisse nützliche Annahme zu bestreiten. Es handelt sich gar nicht (in erster Reihe,

um eigentliches, sondern um verändertes Cholesterin (Oxy, Ch.-Oxydate). Er sagt, wenn man von der Gravimetrie ausginge, so sei alles ebenso auf seiten der Colorimetrie (erzeugt durch Zuschuß an Farbtiefe) nicht von Cholesterin usw. ausgegangen, da die Träger der Farbreaktion nicht mit Digitonin fällbar seien. Für diesen, durch Verseifungsversuche näher belegten Standpunkt glaubt er den Unterschied in dem Verlaufe der Farbreaktion anführen zu sollen. Die Nuance der (fremden) Träger des Liebermann - Burchard sei zwar im gewissen Stadium dieselbe wie die des echten Cholesterins, jedoch sei die Entwicklung eine andere, das Abblässen und Umfärben werde schneller. Rückstände gaben einmal tatsächlich die rötliche Essigschwefelsäurereaktion von Lifschütz. Auf die Kenntnis der Digitoninfällung des Oxycholesterins und sein Verhalten im weiteren Gange der einschlägigen Analyse spitzt sich also die Frage der Abweichungen zwischen Gravimetrie und Colorimetrie zu. Muellers Auffassung ist nun letzten Endes die, daß das von der Colorimetrie erzeugte Übergewicht direkt auf das Cholesterin weise, nicht auf die teilweise Zerstörung der eigentlichen Substanz oder auf Ungenauigkeit der Gravimetrie.

Wenn diese Auffassung sich als richtig erweist, so kann es nur einen Weg geben, den wir oben erörterten. Er gipfelt in der Einsicht und dem Bestreben, das Gesamtcholesterin schonend und ohne Abzug durch angreifende Hydrolysen (präformiert), zu gewinnen. Dabei müssen dann die relativ empfindlicheren Stoffe einem Verluste entgehen. Sieht man von technischen Einflüssen störender Art gegen die Träger der Liebermann-Burchardschen Reaktion ab (deren Beurteiler zwar controvers. Bloor, Mueller, Weston sind), die wir aber als vermeidlich und der Methodik Bloors bei richtiger Handhabung nicht abträglich charakterisierten, so kann es sich nur darum handeln, durch ein geeignetes Verfahren (Isolierung und Bestimmung) die höchsten Werte für Gesamtcholesterin zu gewinnen und vorzugsweise zu diskutieren. Diese müssen durch Differentialanalysen (vgl. Gesamtreaktion und Blutzucker) geläutert werden.

In der vorstehenden Betrachtung zur Frage der Objektivität der mikrochemischen Colorimetrie von Cholesterin aus Blut und Organextrakten im direkten Vergleich zur gravimetrischen Digitoninfällung ist lediglich die Liebermann-Burchardsche Reaktion herangezogen. Der Grund für dieses einseitige Vorgehen ist die Tatsache, daß sie fast ausschließlich von Methodologen und praktischen Untersuchern benutzt wird. Grigaut, der den ersten Anstoß zur Colorimetrie des Blutcholesterins gab, Henes, Authenrieth und Funk, Csonka, Gettler u. Baker, Bloor usw. arbeiteten mit dieser Probe. Sie ist indes nur eine der Möglichkeiten und kann gegen die übrigen nach ihrer Variabilität, d. h. der Entwicklung und den Wandlungen der Nuance, deren Haltbarkeit und nach ihren Interferenzen abgewogen werden.

Bei Authenrieth und Funk nimmt die Handhabung der Liebermann-Burchardschen Reaktion folgende Gestalt an. 0,1 ccm Serum ist in dem zu prüfenden Extrakt nach seinem Cholesteringehalte vorhanden in 5,0 ccm Chloroform; 2,0 ccm Acetanhydrid, 0,1 ccm Schwefelsäure werden beigelegt, geschüttelt; die Mischung

bleibt 15 Minuten bei 35° im Dunklen und wird gegen den Colorimeterkeil verglichen. Eine ad hoc hergestellte Vergleichslösung würde 1,2 mg Cholesterin enthalten.

Bloor benutzt ein Verdünnungsverhältnis, dem in 5,0 ccm Chloroformlösung 0,3 ccm Serum entsprechen. Die Reagenzien folgen wie oben. Stehen im Dunklen 15 Minuten. Die Vergleichslösung enthält in 100 ccm Chloroform 2,7 mg Cholesterin und 4,0 ccm Acetanhydrid nebst 0,2 ccm Schwefelsäure. Nach dieser Methode arbeitete u. a. Denis (1917).

Aus den einschlägigen Studien der Methodologen geht hervor, daß — selbst in „reinen Lösungen“ die Liebermann-Burchardsche Reaktion eine gewisse technische Empfindlichkeit zeigt, und daß jedenfalls die Reinheit der Reagenzien mehr als bisher unterstrichen werden muß. Uns ist aus Rücksprachen und Korrespondenzen bekannt geworden, daß man sich bei bloßen Anwendungen oft mit den „beigemischten“ Nuancen abgefunden hat. Zweifellos enthält das auch von Fachleuten gewonnene Material — speziell nach Authenrieth und Funk — überwiegend, nicht eingestandenermaßen Zahlen, die unter zu leichter Wägung zweifelhafter Färbungen gewonnen sind. Ist man schon in „reinen Lösungen“ zur Vorsicht gegenüber der Farbentwicklung und dem Treffen der maßgebenden Nuancen gezwungen, so steigert sich die Schwierigkeiten in Extrakten bedeutend, weil nach unserer Beobachtung das Reifen bis zum Grün verzögert oder verschoben werden kann. Am nächsten kommt man dem gewünschten Ziele sicher, wenn 1. Aufspaltung bis zum Cholesterin selbst erreicht, 2. Abscheidung essentieller Begleiter oder reaktiver Interferenten erstrebt wird und 3. wenn der Endextrakt möglichst wasserfrei gehalten wird. Am einfachsten sucht die Authenriethsche Vorschrift das Ziel zu erreichen, über die noch beobachteten Störungsmöglichkeiten und ihre Bekämpfung haben wir schon gesprochen (s. o.). Hält man sich nun die Tatsache vor Augen, daß die Vorschriften tunlichst im ganzen pathologischen Bereich zu dienen bestimmt sind, so wird man auf Grenzfälle Bedacht nehmen. So nimmt es kein Wunder, daß die meisten Isolierungen (s. o.) besondere Sicherungsmaßnahmen gegen Interferenten oder Arbeit auf „Reincholesterin“ ins Auge fassen. Zweifellos sind Westons (1916) und Csonkas (1916) Angaben handlich und sicher. Wir haben Aufmerksamkeit auf choleämische Bilder verwendet, in denen sie ebenso wie in sonstigen Komplikationen ein ziemlich reines Gesamtcholesterin zur Messung bringen. Gibt man tatsächlich nur „Gesamtcholesterin“, so ist die Arbeit unter energischer Spaltung — wenn das Cholesterin als unangreifbar gelten kann — diejenige, welche nach geeigneten späteren Maßnahmen (s. o.) die besten Vorbedingungen für eine Liebermann-Burchardsche Reaktion gibt. Auf Gesamtcholesterin zu arbeiten, ist denn auch tatsächlich die einfachste Aufgabe, unter deren Gesichtspunkt man die Schwierigkeiten der Bloormethode nicht allein betrachten darf. Die bloße Extraktions-

technik Gettlers nimmt eine Mittelstellung ein; meist gelangen störende Interferenzen mit in die Extrakte; das Verfahren selbst ist eingreifender als das Bloors. Nach Gettler und Baker kann man Cholesterin fraktionieren. Die erste Stufe der Vorschrift von Weston und Kent und die Gesamttechnik Bloors zeigen — mutatis mutandis — ähnliche Züge, wie folgende Vorschriften zeigen.

Bloor erwärmt Alkoholäther (3 + 1) und läßt langsam unter Schütteln 3,0 ccm Blut, Serum, Plasma oder Körperchen auf ca. 100 ccm Extraktionsmittel einlaufen, erwärmt, füllt auf und benutzt die Lösung zur Bestimmung von Gesamtcholesterin (s. o.), ebenso von Lecithin und Fett.

Weston und Kent benutzen eine Alkoholfällungs-Äthererschöpfungs-methode wie folgt (Grundzüge): 2½ ccm Serum werden mit 10 Vol. Alkohol 24 Stunden lang bei ca. 60° erschöpft, abfiltriert; der Rückstand zweimal mit heißem Alkohol gewaschen, dann 24 Stunden mit Äther erschöpft und die Extrakte gemeinsam eingeengt. Diese können nach erneutem Aufnehmen, z. B. in Chloroform, direkt (nach Bloor) geprüft werden. Weston und Kent schließen eine Verseifung an (s. u.).

Nun haben Weston sowie Feigl (spätere Untersucher s. u.) festgestellt, daß Zahlen nach Bloor tatsächlich höher sind als nach anderen Methoden. Weston, später auch Myers, meinen, eine nicht befriedigende Isolierung zugesetzten Cholesterins gesehen zu haben. Befunde des ersteren sind tatsächlich sehr ungünstig. Bei Weston scheint in Sachen der Bloortechnik ein Komplex vorzuliegen: nicht sichere Isolierung, Störung in den Extrakten, nicht befriedigende colorimetrische Reaktion. Zudem kehrt das Bedenken der Mischfarbtöne wieder.

Nun kann man unseres Erachtens billigerweise die Bloorsche Technik nicht auf derselben Basis mit den übrigen für Gesamtcholesterin diskutieren. Bloor will Cholesterin und Ester (und eventuell ähnliche Stoffe) schonend quantitativ isolieren. Er will im Extrakte freies Cholesterin von Estern trennen. Dazu eignen sich sonst nur Erschöpfungsverfahren oder differentielle Verseifung. Ferner will Bloor einen einheitlichen Extrakt für mehrere Fragen des Lipämiegebietes geben. Das sind alles Sonderforderungen. Auch nach unseren Erfahrungen geben Bloorextrakte relativ hohe Erträge nach Liebermann-Burchard. Aus anschließenden Beispielen und späteren Befunden wird man ersehen, daß die Abweichungen zum guten Teile von der Beschaffenheit der Seren abhängen, daß bestimmte pathochemische Komplexe besonders reagieren. Wir haben mit der (ja auch von Denis übernommenen) Technik durchweg gute Ergebnisse erzielt. Die Frage der Wiedergewinnung zugesetzten Cholesterins ist nicht so einfach beantwortet. Solche Zusätze sind technisch schwer zu prüfen. Jedenfalls haben wir nach manchen vergeblichen Versuchen, die Zusätze gut zu verteilen, schließlich mit Kunstgriffen arbeiten müssen.

Es mag an dieser Stelle dargelegt werden, daß man bei allen vor-

liegenden Prinzipien zwar methodologisch scheiden kann, daß aber diese Scheidung nicht von sich aus berufen ist, die für sich allein stehende und für sich zu diskutierende Methodik Bloors aufzuklären.

In der wichtigen Frage, ob die colorimetrischen Arbeitsweisen in ihrer jeweiligen Gesamtheit, d. h. im ganzen, bestehend aus Isolierung und Bestimmung, zugleich die praktisch besten und die wissenschaftlich (vollwertigsten oder mindestens annähernd gleichberechtigten) durchaus befriedigenden etwa in einer Höhe mit der auf durchgreifende Isolierung gestellten Digitoninfällung sind, treffen sich zu viele Gesichtspunkte, die m. E. nach Weston (1916) und nach Myers (1919) nicht aufklärbar sind. Auch steht die Bloormethode ja im System des Autors weiterhin zur Diskussion, was über die isolierte Bestimmung von Gesamtcholesterin (Bloor) und dessen Aufteilung (Bloor - Knudson) weit hinausgreift. Erst von dieser Stelle wächst sich die Frage wirklich zu größerer Bedeutung aus, weil Cholesterin einmal als solches herausgezogen und bestimmt wird, auf der anderen Seite im komplexen nephelometrischen Arbeitsgange unter Voraussetzungen steht, die später von F. A. Csonka (1918, 1920) durchgearbeitet sind.

Wie die Darlegung der einschlägigen Literatur ausweist, herrscht ein Auseinanderstreben vor, das durch die verschiedensten Entwürfe bereichert, aber auch abgelenkt, in zahlreichen beschreibenden Arbeiten zum Ausdruck kommt, ohne daß die Grundfragen erörtert wären und Versuche zur Abgleichung auf lohnende Anknüpfungen sich beziehen könnten.

Zweifellos haben alle Methodologen Anschluß an präzise Ausführungsformen der Digitoninmethode zu finden gesucht, wie oben beschrieben wurde. Eine ganz neue systematische Arbeit von Joh. Fex beschäftigt sich sehr sorgfältig mit dieser, namentlich von Thaysen in wichtigen Studien geprüften Methodik¹⁾. Die Digitoninmethode ge-

¹⁾ Unsere vorliegende Mitteilung ist im Zusammenhange mit den vergleichenden und beschreibenden Studien Feigls zum Lipämiegebiete (1917—1920) durch mehrjährige Arbeiten in Fluß gekommen und lag schon Anfang 1919 nahezu fertig vor. Abgesehen von anderen Aufgaben haben die Fertigstellung verzögert Anstöße der verschiedensten Art (Nephelometrie u. a.), die demjenigen, der sich auf dem so vielseitig gewordenen und verwickelten Gebiete bewegt, immer wieder Ergänzungen und Revisionen nahelegen. Auf bisherige Urteile nach vergleichenden Versuchen hoffte Verf. hier hinweisen zu dürfen. Die umfangreiche Arbeit von Joh. Fex (Lund) (Biochem. Zeitschr. **104**, H. 2/3, S. 82—174. 1920) wird eine Fundgrube bleiben, bewegt sich aber, wie mir ein näheres Studium alsbald zeigte, auf einer anderen Linie und umgreift das Gesamtgebiet. In den reichen literarischen Grundlagen, die Fex mit größter Sachkunde zu verwerten bestrebt ist, fehlen manche, derzeit nicht zugängliche Einzelheiten, die mir zu Gebote standen. So wird meine Arbeit — abgesehen von anderen Voraussetzungen — die einschlägigen Fexschen Gesichtspunkte zu ergänzen vermögen. Herrn Fex bin ich für die liebenswürdige Zusendung des Sonderdruckes zu Dank verpflichtet.

hört — abgesehen auch von der Liebermann-Burchard-Probe der Ester nach deren Cholesteringehalt — zu dem das Bloorsche System kompli-

Ob das Fexsche Urteil über den relativ geringen (wissenschaftlichen) Wert der Colorimetrie voll aufrechterhalten werden darf, wird zu prüfen sein. In praxi hat er — die Digitoninmethode in gesicherter Form als Basis nehmend — recht. Im übrigen zeigt auch die Fexsche Arbeit, daß die vorliegende Frage bei der Tatsache, daß viele und verwickelte und z. T. nicht einheitliche Urteile ein verwischtes Bild geben, wohl nur durch den Versuch einer nicht zu eng gefaßten Literaturübersicht und einschlägiger Bewertung durchsichtiger dargestellt werden kann.

In vieler Hinsicht ergab sich bei Abfassung meiner Arbeit eine Entlastung insofern, als ich mich auf Fe x beziehen darf, der ja auch Originalangaben ziemlich wörtlich übernimmt. Entsprechende Abschnitte durfte ich daher fortlassen, da ich auch annehmen möchte, daß sich die Untersuchungen von Fe x mit meiner Mitteilung gemeinsam benutzen lassen werden, wesschon wir in der Fragestellung nicht ganz und gar übereinstimmen, die Fexsche Arbeit einen weiteren Kreis zu ziehen sich bestrebt und wenn — letzten Endes — mein Urteil über die Colorimetrie doch günstiger ausfällt. Darin erblicke ich jedoch einen nicht unerheblichen Ertrag, wie meine einleitende Erörterung zu zeigen wünscht — im Interesse der etwaigen Konsolidierung oder wenigstens relativen Erhärtung mancher bisherigen Erträge des großen, von vielen Forschern bearbeiteten, pathochemischen Gebietes und ebenso mit Rücksicht auf die fernere praktische Brauchbarkeit der Colorimetriesysteme.

Die Arbeit von P. G. Weston ist bekanntlich (s. u.) zu einer Tabelle verdichtet, die, wie manches andere wertvolle Material vieler Arbeitsstätten weder im Original noch in den (zumeist recht wenig befriedigenderen) Referaten der Kriegszeit zugänglich war. Auch Herrn Fe x fehlte diese (neben anderen).

Tabelle I (P. G. Weston, Journ. of Biolog. Chem. 28, 386. 1916/17.)
mg Cholesterin für 1,0 ccm Serum.

Methode	Serum	Colorimetrie		
		Bloor	Authenrieth	Weston
Bloor	A*	2,12	2,40	
	A**	1,89	1,62	1,73
Bloor	B	1,71	2,88	
	B**	1,56	1,88	2,70
Authenrieth	A	2,12	1,86	1,84
	B	1,89	2,87	2,85
Weston - Kent	A	3,83	1,84	1,85
	B	3,11	2,86	2,85
Csonka	A	2,16	1,85	1,84
	B	2,22	2,87	2,83
Gettler-Baker	A	3,51	1,83	1,84
	B	3,00	2,85	2,85
Weston (1916)	A	3,83	1,85	1,85
	B	3,96	2,87	2,86

A* = natives Serum, B = natives Serum + 1,0 mg Cholesterin für 1,0 ccm Serum,
** Nach Weston - Kent aufgearbeitet.

zierenden Kreise. Sie nimmt eine wichtige Stellung ein, von der aus (Cholesterin in Esterbindung nach Prozenten des Gesamtcholesterins) die Methode an sich beurteilt werden muß.

Im Anschlusse möge zunächst die neue Arbeit von Myers und Wardell, welche von Verseifungstechniken (s. o.) absieht, mit den maßgebenden Einzelheiten besprochen werden.

Myers und Wardell entfernen sich entscheidend von dem derzeitigen Stande der Isolierungsmethodik für schnelle mikrochemische Analyse des Blutcholesterins¹⁾.

Sie stützen sich auf die Digitoninmethode. Müller (s. o.) hatte die Ausführung nach Fraser und Gardner überarbeitet. Es ist klar, wie sehr es in allen Fragen auf die jüngst differentialdiagnostisch, namentlich von Lifschütz fruchtbar studierte Digitoninfällung ankommt. Myers ist demnach vorsichtig zu Werk gegangen. Er zieht mit Müller gehärtete Papierfilter vor. Heißes Wasser löst überschüssiges Digitonin leicht und prompt. Äther ist zwecks Waschung dem Alkohol weit überlegen. Zu den sehr sorgsam gemachten Vergleichsversuchen diente ein Ansatz aus 10,0 ccm Blut, das mit Lauge verseift wurde usw.

Myers und Wardell bestätigen die Arbeitsweise Bloors, Cholesterinester nach ihrem Cholesteringehalt quantitativ zu messen, in genauen Versuchen. Ihre Technik gibt gute Parallelwerte. Digitonin und eigenes Verfahren stimmen genügend überein. Bloors Zahlen sind weit höher²⁾.

Einen für die ganze Frage, speziell aber die Isolierungsbedingungen, wichtigen Punkt berührt dieser Versuch mit Zusätzen³⁾. Cholesterin war zur Blutprobe gefügt worden³⁾ und sehr gut gemischt worden, bevor die Verarbeitung (Bloor, Autoren) einsetzte. Es wurde in „zureichendem Grade“ wieder durch Isolierung gefunden, wenn nach Myers trocken mit Chloroform erschöpft wurde. Nach Bloor gelang das nicht im gewünschten Grade⁴⁾. Macht man nun gleichwohl den an anderen Punkten der Blutanalyse als gewichtig — unter Bangs Vorgang beim Zucker — zweifellos anzuerkennenden (Feigl, RN-Stoffe, speziell

¹⁾ V. C. Myers und E. L. Wardell l. c. sowie L. Kast und dies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **15**, 1. 1917/18; s. auch Myers und Gorham, Arch. Int. Med. **15**, 599. 1917, sowie dies. Post-Graduate **29**, 938. 1914.

²⁾ Beisp. Digit 0,149% bzw. 0,111% bzw. 0,072% bzw. Myers - W. 0,139% bzw. 0,108% bzw. 0,077% bzw. Bloor 0,206% bzw. — bzw. 0,095%, ferner Bloor 0,238% bzw. Myers 0,164% u. v. a. (Nach Tab. II, l. c. S. 155). Dasselbe zeigt Tab. I eberda, S. 154 (Bloor sowie eigene Methode, Cholesterin, frei von Ester, als Zusätze gegeben) (s. jedoch Text).

³⁾ 1,0 ccm (2,0 ccm) einer 0,08proz. Lösung zu 1,0 ccm Blut; dgl. Palmitat in 0,2proz. Lösung 1,0 ccm auf 1,0 ccm Blut.

⁴⁾ Tab. I, S. 154: Bloor zu Myers - Wardell ohne Zusätze 1,87 mg/ccm bzw. 2,15 mg/ccm zu 1,35 mg/ccm bzw. 1,33 mg/ccm. Dgl. mit 0,8 mg Chol.-Zusatz (vgl. Fußnote 3) 2,33 mg/ccm zu 2,19 mg, bzw. ferner mit 1,6 mg Chol.-Zusatz 2,89 mg/ccm zu 2,96 mg/ccm bzw. ferner mit 2,0 mg Chol. palm.-Zusatz 2,75 mg/ccm zu 2,57 mg/ccm.

Kreatinin usw.) Einwand, daß Zusätze Sonderbedingungen ohne gründliche Durchsichtigkeit der Folgen schaffen, so sind die, zwar kurzen, Versuche und ihre Urteile doch weittragend. Einmal gilt das für das von Bloor durchgebildete Prinzip an sich, wie speziell für seine Technik. Sonach ergeben Myers und Wardells Versuche methodisch eine neue Perspektive, die zur fernen Durchprüfung zwingt. Es ist möglich, was ja auch anderen Techniken nachgesagt wurde, daß kleine Abweichungen der Versuchsbedingungen — ganz abgesehen von dem Zustande der „Zusätze“ — sich bemerkbar machen. Es ist bedeutungsvoll, gerade die Aufgabe des „vollen Wiederfindens“ künstlicher Zusätze in chemisch abgearteten pathologischen Blutarten zu suchen. Unabhängig von obigen Erwägungen greift aber die folgende wesentliche Kombination ein. Setzt man die bestechenden Prüfungen von Myers und Wardell als (nicht nur für deren vorliegende Blutprobe, sondern generell) beweiskräftig voraus, so soll der von Weston, Feigl, Luden, Müller, Myers gefundene „relativ sehr hohe Ertrag nach Bloor“ mit der nicht voll ergebigen Extraktion (et. par. des nativen Cholesterins) in Einklang gesetzt werden. Ohne schon hier ins einzelne gehen zu wollen, darf man der oben gegebenen Auffassung über „Brutto-Cholesterin“ (nach Bloor) näherkommen, auch wenn für einige weitere Methoden mit Extraktionsdefizits gerechnet werden kann.

Aus der Arbeit von Myers und Wardell heben wir noch hervor 1. die Technik des zur Kontrolle angesetzten Digitoninversuches, der mit jüngeren Verbesserungen ausgestattet ist¹⁾ und ferner 2. die hier methodisch mittelbar, aber in klinisch-pathologischen Zusammenhängen weitgehend zutreffende Bestimmung des Kotoholesterins (Koprosterins) auf sinngemäß (technisch) ergänzter und ausgebildeter Basis²⁾.

Was die Technik der Colorimetrie angeht, so ist die oben behandelte Beimengung „bräunlicher Nebenfärbungen“ und „unspezifischen Nuancen“ im Bloorprozeß für Myers die Ursache geworden, zur „Reinisolierung“ zurückzugreifen.

Myers hat im Verfolg von Authenrieths Vorgang den Vergleichskeil an Helliges Instrument mit dem permanenten Standard gefüllt (s. o.). Hier knüpft ein späterer Untersucher (s. o.) an. Myers selbst scheint nach seiner Schilderung das Keilinstrument später weniger bevorzugt zu haben, da er sich eine besondere, auch uns nützlich scheinende Einrichtung im Kober oder Dubosq entworfen hat. Zweifellos ist das vorzügliche „kleine“ Colorimeter von Schmidt und Haensch (nach Joh. Plesch „Chromophotometer“) in Amerika nicht zureichend bekannt oder nicht genügend zugänglich. Es hat ganz erhebliche technische Vorzüge vor fast allen anderen Instrumenten bei vorzüglicher Optik, sehr gefälligem Bau und großer Leistungsfähigkeit.

¹⁾ l. c. S. 155.

²⁾ l. c. S. 152. Diese Technik hat Verf. im Verfolg einschlägiger Studien in Verbindung mit älteren (u. U. weniger befriedigenden) guten Vorschriften zu Reihenbeobachtungen gedient.

Sehr wichtig ist in prinzipieller Hinsicht also der Vergleich zwischen der neuen Technik von Myers und Wardell und den älteren auf Isolierung als „Reincholesterin“ zielenden Vorschriften. Zum Teil ist diesen (s. o.) nachgesagt worden, daß sie Defizits mit sich bringen. Myers scheint seiner Technik eine Mittelstellung zwischen diesen und Bloor zuzubilligen, wonach also die Isolierung quantitativ und der Farbertrag rein erscheinen würde — zwei Gesichtspunkte, in denen die sonstigen Vergleiche (Myers, Feigl, Luden) auseinanderlaufen. Oft sind, allerdings in größeren Maßstäben, den Extraktionen schlechthin Defizits nachgesagt worden, und zwar mit Recht (s. o.). Hier kann der Maßstab die Gefahr beheben*).

Über die Methodik von Myers und Wardell äußerte sich kürzlich Myers¹⁾ in einer reichhaltigen, auch methodisch durch die Sonderaufgabe der Objekte wertvollen Arbeit. Er bediente sich des oben beschriebenen Verfahrens, lehnte aber den derzeit vorgeschlagenen Dauerfarbstoff „Naphtholgrün B“ im Keile ab. Er beobachtete bei der Farbreaktion eine Abweichung ins Blau hinein, die die Benutzung ausschloß. In Blutextrakten seiner Wirbellosen traten rötliche Mischfarben auf. Man wird diese ziemlich bestimmt gefaßte Angabe als wertvoll für analytische Aufgaben am Blute niederer Lebewesen ansehen, wo doch methodisch so wenig Ähnliches bekannt. Er nahm eine Vergleichslösung von 1 mg reinstem Cholesterin (Kahlbaum) in 100,0 ccm Chloroform²⁾.

Die Arbeiten Bloors haben in der Frage der mikroanalytischen Cholesterinbestimmung zwei Wege kritischer Untersuchungen freigemacht. Auf der einen Seite hat Bloor nephelometrische Prinzipien für Cholesterin und Fett sowie für deren Ester (auch in Gemischen) betätigen müssen, die im Analysensystem Bloors wesentlich sind³⁾. Sie sind später von Csonka eingehend durchgearbeitet worden⁴⁾; auch Kleinmann⁵⁾ und Feigl⁶⁾ haben sich methodisch mit den genannten Voraussetzungen befaßt⁷⁾. Daneben erscheint Cholesterin (gesamt, Esteranteil) als selbständige analytische Größe, wie beschrieben⁸⁾. Weston⁹⁾, Feigl¹⁰⁾, Müller¹¹⁾, Luden¹²⁾, Myers und Wardell¹³⁾ haben auf die vergleichend-kritischen

*) Neue Messungen und Prüfungen des Colorimeters bei H. Kleinmann, Diss. Berlin 1919 und Biochem. Zeitschr. 1919, Heft 1/6.

¹⁾ Jüngere einschl. Lit. siehe bei Joh. Feigl, Biochem. Zeitschr. 1918 (L. II).

²⁾ Rollin, G. u. Myers, Journ. of Biolog. Chem. **41**, 119ff. 1920 (Blutanalysen an Wirbellosen) ebenda 137 (Walblut). S. a. Ber. über ges. Physiol. (Rona) **1**, 125. 1920 (ref. Riesser).

³⁾ W. R. Bloor, Journ. of Biolog. Chem. **26**, 577/601. 1916 (Überblick, System, Lit.).

⁴⁾ Fr. Csonka, Journ. of Biolog. Chem. **34**, 577. 1918, sowie W. R. Bloor, Journ. of Biolog. Chem. **17**, 377. 1914.

⁵⁾ H. Kleinmann, Diss. Berlin 1919, Nephelometric.

⁶⁾ J. Feigl, Centralbl. f. inn. Med. 1920, Nr. 20.

⁷⁾ J. Feigl, Lipämie VII. Biochem. Zeitschr. 1920.

⁸⁾ s. o. Bloor, Bloor-Knudson.

⁹⁾ P. G. Weston, Journ. of Biolog. Chem. **28**, 383. 1916/17.

¹⁰⁾ J. Feigl, Biochem. Zeitschr. 1918. S. u.

¹¹⁾ Ph. G. Müller s. o.

¹²⁾ G. Luden, Journ. of Biolog. Chem. **29**, 463. 1917.

¹³⁾ V. C. Myers und E. L. Wardell, Journ. of Biolog. Chem. **36**, 147. 1919.

Probleme Aufmerksamkeit verwendet. Feigl hat — ebenso wie Weston — Vergleichswerte nach gebräuchlichen Methoden gegeben. Luden, eingehender Feigl¹⁾ haben in Rücksicht auf (speziell Wielands Feststellungen) den „Mehrertrag“ nach Bloor auf die Abweichungen in den isolierenden Maßnahmen geschoben; die indifferente Extraktion überführt auch „Interferenten“ (Gallensäuren, Farbstoffderivate). Luden hat zahlenmäßige Befunde aus der Pathologie gegeben. Jedenfalls haben die genannten Untersucher auch Farberscheinungen beobachtet, die auf Nebenreaktionen deuten. Feigl hat versucht, bei Bloors Vorgehen den Mehrertrag so aufzufassen, daß er den angreifenderen Isolierungen z. T. entgegenhe. Er hat auch kombiniert, dem evtl. faßbaren Cholesterin, als solches umständlicher isoliert, z. B. nach Weston und Kent²⁾, nach Csonka³⁾, die Interferenten beizustellen (weiterer Umfang der Liebermann-Burchard-Probe: Oxycholesterin, Gallensäuren). Man kann aus Feigls Materialien, evtl. im Beihalt der Befunde von Luden, manches Einschlägige ersehen.

Die Arbeit von Myers und Wardell bezweckt eine analytische Ausführung der Liebermann-Burchardprobe auf Grund veränderter Isolierungstechnik. Serum wird mit Gips (1 ccm + 4 bis 5 g) verarbeitet, erhärtet, in einfacher Extraktionsapparatur kleinsten Maßstabes auf Cholesterin hin mit Chloroform extrahiert. Man filtriert, schafft ein einheitliches Vol. und stellt in bekannter Weise die Liebermann-Burchardprobe an.

Myers rechnet dem Gips eine günstige Abfangwirkung gegenüber störenden Stoffen (essentieller und reaktiver Natur) nach. Chloroform wirkt „günstig“, selektiv extrahierend. Wasserfreies Arbeiten ist gefordert. Im Dubosq, der dem Hellige vorgezogen wird, benutzen die Autoren schwarze Zylinder (Klett), 15,5 cm Schichthöhe. 0,005% reine Naphtholgrün B-Lösung ist farbengleich mit 15,0 cm Schichthöhe (Kober, Dubosq) eines Ansatzes aus 0,4 mg Cholesterin (5,0 ccm Chloroform, 2,0 ccm Acedanhydrid, 0,1 ccm konz. Schwefelsäure).

Versuchsmaterialien und Ergebnisse.

I. Anwendung einiger colorimetrischer Prinzipien auf die Bestimmung von Cholesterin (und Ester) in reinen Lösungen unter Ausschluß der isolierenden Prozesse.

In der obigen Darlegung wurden einige Urteile bereits gegeben. Angaben in den älteren systematischen Studien zum Lipämiegebiet (Feigl) werden hier anzuziehen sein, desgl. wird auf die Arbeit von Fex (Seite 112ff). bezug genommen.

a) Arbeit im genauen Colorimeter mit reinsten Reagenzien unter peinlichem Ausschluß jeder möglichen Fehlerquellen⁴⁾. Derselbe Beobachter. Zeitlich strenge Parallelität zwischen

¹⁾ Joh. Feigl, Biochem. Zeitschr. 1918, 1920, I. c.

²⁾ P. G. Weston und G. H. Kent, Journ. of med. research 26, 531. 1912; P. G. Weston ebenda 27, 87. 1912.

³⁾ F. A. Csonka, Journ. of Biolog. Chem. 24, 431. 1916.

⁴⁾ Vgl. hierzu die a. a. O. genannte Arbeit von H. Kleinmann (1919).

Versuch und Vergleich (tunlichst einheitliche Reifung); Vergleiche und Versuche weitgehend angepaßte Mengen.

Auf 100 Bestimmungen mit Cholesterinmengen zwischen 0,1 mg und 1,0 mg ergaben sich im Ansätze nach Authenrieth - Funk folgende prozentische Fehler:

Maxima 2,5 (+); 2,0 (—), je einmal. Minima $\pm 0,2$ und darunter 50 mal; zwischen 0,3 und 0,2 (+), zwischen 0,2 und 0,1 (—), 6 mal bzw. 5 mal, zwischen 0,2 und 0,1 (+), 4 mal, unter 0,1 (+) und 0,1 (—) 3 mal.

In gleichem Gange nach Bloor war das Bild cet. par praktisch nicht anders.

Auf 20 Bestimmungen an Cholesterinpalmitinsäureester nach Authenrieth - Funk mit Cholesterinmengen obiger Breite wurden 2,0 (+), 2,8 (—) als Maxima 1 mal bzw. 2 mal gesehen. Minimalbreite war 12 mal vertreten.

Nach Bloor veränderte sich das Bild nicht wesentlich.

Auf 20 Bestimmungen an Cholesterinoleinsäureester fallen dagegen die Zahlen weiter auseinander, auch unter obigen präzisierenden Voraussetzungen für die Technik. Der Minimalbereich erreicht nur die halbe Trefferzahl. Einmal ist 4,0 (+) beobachtet worden.

Nach Salkowskis Probe (Weston) wurden Ester bisher nicht geprüft, die Aufgabe steht noch aus.

20 Bestimmungen, sinngemäß übertragenes Volumen der obigen Mengen Cholesterin, ausgeführt nach Tschugaeff (Iscovesco) geben einen Maximalfehler von 5,5%, Minimalbereich in 9 Fällen.

Obige Technik der Liebermann-Burchardprobe in Reihenordnung nach Grigaut gibt für Cholesterin und die genannten Ester Verteilungsbilder der Fehlerquellen, welche nicht grundsätzlich abweichen, Maximum 4%; Minimalbereich zu 48% der Reihe besetzt.

Im gleichen Gange — als Reihenverfahren nach Weston (Salkowski ausgeführt) — waren Maxima mit 2,7 (+) und 3,4 (—) je einmal vertreten, Minimalabweichungen (s. u.) zu 35% der Reihe zu beobachten.

Die unter a) nach strengen Voraussetzungen geordneten Versuche, jeweils den Spezialtechniken nachgebildet, gestatten folgende Beurteilung:

So hohe Fehler, wie sie bei Fex gehäuft und (einmal) bei Müller (s. o.) vorkommen, haben wir nicht gesehen. Auffallend hoch erscheinen bei uns in den Reihen die Treffer im Minimalbereich selbst und hart an diesem. Bei einigen Maximalfehlern können wir der Vermutung Raum geben, daß es nicht völlige Beherrschung der strengen Anforderungen der Versuchstechnik war, welche solche Ausschläge — sei es — schufen, — sei es — vergrößerten.

Hierhin rechnen wir die in ihrem Auswirken ja gekannten und daher methodisch streng geforderten Bedingungen der Temperaturhaltung, des

Säurezusatzes u. a. m. Wir haben jene, soweit möglich, technisch präzisiert, z. B. die Säure aus Mikrobüretten genommen u. a. m. Es wird also in einigen Fällen der Maximalfehler die Abmessung der Säure trotzdem nicht gelungen sein oder der Vorgang der Farbentwicklung durch etwa doch noch vorhandene „Unreinlichkeit“ oder sonstige Störung beeinflußt worden sein.

Diese maximalen Fehler sind Tatsache, kommen in jeder Reihe immer nur vereinzelt vor und sind unter allen Kautelen, die mit äußerster Strenge beobachtet werden, nicht auszuschließen. Einzelfehler sind von früheren Untersuchern öfters zugegeben worden¹⁾. Sie waren dann regelmäßig bedeutend höher²⁾. Sie sind — gleichgültig, welcher Höhe und in welcher Arbeitsform — unseres Erachtens nur Folgen einer unvollständigen Strenge in der Beherrschung der Techniken. Das unterläuft am leichtesten bei Tschugajew-Iscocevso, weshalb auch diese Technik sich nicht empfiehlt, es sei, daß man aus dem sehr hohen, spezifischem Farbertrage methodisch Nutzen ziehen will. In Reihenanordnungen ist bei Aufrechterhaltung aller Vorsicht die Genauigkeit nicht schlechter als beim Arbeiten im Präzisionscolorimeter unter Farbentwicklung der Vergleichsansätze, soweit Liebermann-Burchard in Betracht kommt. Nachträgliche Änderungen eines in der Farbentwicklung stehenden Ansatzes stören unregelmäßig, aber zumeist erheblich, eines schon stabilisierten Ansatzes weniger auffallend. Alles trifft nur für reinste Reagenzien und Geräte zu. Man sieht aber immerhin schon aus unseren Reihen, daß unsere Erträge die Colorimetrie in reinen, genau gekannten Lösungen wesentlich günstiger darstellen, als man bisher annehmen mußte. Auch für den Fall, daß in Estern der Cholesterinbetrag reagierte, trifft das unter allen Kautelen genugsam zu. Gesättigte Fettsäuren schaffen jedoch — in reinsten Präparaten — bessere Grundlagen als die Oleate.

Wir haben also für die Erscheinungen der Liebermann-Burchardprobe in reinen Lösungen einen prinzipiellen Standpunkt gewonnen, der sie als durchaus leistungsfähig hinstellt — als jedenfalls ungleich präziser, als man bisher anzunehmen gehalten war. Wir haben das unter extremen technischen Vorsichtsmaßnahmen erreicht, die wir auch bei

¹⁾ Ph. G. Müller (Journ. of Biolog. Chem. **25**, 549. 1916) hat 0,56 mg statt 0,6 mg; 1,78 statt 1,8 mg; 2,41 statt 2,4; 0,86 statt 1,08 mg gefunden. Eine Trefferverteilung der Fehler ist zwar nicht zureichend ableitbar.

²⁾ Johann Fex (Biochem. Zeitschr. **104**, 112. 1920), 21 Zahlenreihen. Unter 10% Fehler (+; —) 10 mal, unter 5% (dgl.) 4 mal; zwischen 10% und 15% Fehler 5 mal; unter 20%, über 15% Fehler 6 mal. Extreme + **23,3%** Fehler und — **18%** Fehler. Minimalfehler + **2,8%** bzw. 3,1%; Maximalfehler + **23,3%**. Fehler in Verlusten 10 mal; in Mehrerträgen 11 mal. Größter Durchschnitt an 10%; + und — halten sich etwa die Wage. (Siehe Tab. II.) Fex arbeitet nur nach Authenrieth-Funk.

wichtigen Arbeiten sonst kaum betätigt haben, und die von keiner Seite von der Methodik verlangt und an ihr geleistet worden sind. Wir haben uns die Frage vorzulegen, wie bei Herabstimmung aller Faktoren auf übliche versuchstechnische Genauigkeit und übliche „gute“ Reagenzien die Fehlerquellen, Fehlerbreiten, Fehlerhäufigkeit sich vergleichsweise ausnehmen. Daß man unter extremster Vorsicht die Methodik auf große Genauigkeit heben kann, ist bewiesen, sie selbst damit rehabilitiert. Es fragt sich, ob man in dem Umfange ihrer Verbreitung und Anwendung und in dem ihr zugedachten Grade einer „schnellen, handlichen“, sogar leichteren Technik, überhaupt in der Lage sein wird, so zu arbeiten, daß sie obige Fehlermöglichkeiten nach Häufigkeit und Graden nicht überschreitet.

c) Wir arbeiten mit haltbaren Standardlösungen (Authenrieth, Myers u. a.; s. o.) und sehen von der Parallelität und Mengengleichheit in der Farbentwicklung ab.

Wir bedienen uns frisch bezogener, kurvenmäßig von der Firma Hellige nach Authenrieth und Königsberger (bzw. nach Funk) durchgeeichter Keile, jedoch übertrugen wir zunächst die haltbare Flüssigkeit in ein Präzisionscolorimeter. Bei der Nacheichung waren mehrfach Fehler (in vierfachen Ansätzen bestimmt) zu beobachten, die jedoch unter 0,5% blieben. Wird mit den unter a) genannten Kautelen gearbeitet, so bleiben unvergleichbare Ausfälle weg. In solcher Anordnung steht die Benutzung des „permanenten“ Standards der Präzisionscolorimetrie (a) unwesentlich nach und hält sich mit der Reihentechnik (b) in einer Höhe. Ansätze nach Authenrieth und Funk, nach Bloor andererseits (s. o.) bleiben auf einer Stufe. Fehlermaxima 4,0% in ganz vereinzeltten Fällen, Besetzung des Minimalbereiches in rund 30% der Treffer. Auch hier ist also cet. par. über die einzelnen Extreme dasselbe zu sagen, wie unter a. Auch hier schon ist es abzulehnen, nuancenungleiche Ansätze messen zu wollen, wenn man einen wirklichen, nicht einen mehr oder minder erratenen Wert zu treffen sucht.

Im Keilcolorimeter nach Hellige unter gesicherter Nacheichung fällt dagegen unter sonst streng eingehaltenen Kautelen die Genauigkeit rasch ab. Unter Ausschluß der Extreme, welche in einer Reihe von 50 Ansätzen (a) zu 3% vorkamen und 4% (+) sowie 3,7% (—) erreichten (Präzisionscolorimeter) und welche hier 7,6% (+) bzw. 6,1% (—) betragen, gruppieren sich die Fehler im Durchschnitt um 3,5%, den Minimalbereich nur zu 8% der Treffer deckend. Die Genauigkeit fällt auf etwa die Hälfte ab, und eine Präzisionstechnik ist cet. par. im Keilinstrument nicht mehr erreichbar, auch wenn die reaktive Form strengstens gesichert war. Die Erhöhung der Breiten, Grade und Häufigkeit der Fehler ist mit dem Instrument an sich gegeben. Bei Wiederholungen wurden — für 95 Bestimmungen insgesamt verrechnet — einmal ein

Fehler von 9,5% gefunden (rund 1%), 5 mal Fehler zwischen 9% und 5% (rund 8%), 45 mal Fehler zwischen 5% und 2,5% (rund 45%) und nur rund 10% der Reihe geben Treffer in Minimalbereich. Damit ist eine Grenze der Colorimetrie — bezogen auf das Instrument von Hellige — gegeben. Kann man die strengsten Reaktionsbedingungen (a) einhalten, so leistet das Instrument Erträge der geschilderten Art — immer noch unter streng wissenschaftlichen Arbeitsbedingungen, die sich weit über die der praktischen Anwendung erheben¹⁾. Mit dem Reaktionsansatz im Keil zu arbeiten, bietet, da das Instrument sich über die obige Leistung nicht erheben kann (sie ist meines Erachtens von den Erfindern auch nicht erwartet worden), keine Vorzüge, weil es unter Umständen geradezu schwer ist, dann die Parallelität zu wahren. Gut durchgeeichte Keile bieten eine dem Instrument an sich angepaßte Genauigkeit, wenn nach a) gearbeitet wird.

Nun habe ich mehrfach Gelegenheit gehabt, ältere Keile zu prüfen. Dabei ergaben sich zum Teil recht achtbare Abweichungen. Das kann man dem Instrument, der Firma, den Autoren kaum zur Last legen. Wir haben auch gesehen, daß kritische Forschungen der letzten Jahre immer mehr auf das Entwicklungsprinzip zusteueren, und daß auch betreffend Cholesterin diese Ansicht fast allein herrschend ist, wie noch jüngste Urteile (s. o. Myers) belegen. Nach den Vorbedingungen a) habe ich an 7 Keilen Abweichungen gefunden, die im Extrem nicht bei unter 10% Fehler (Einzeltreffer) stehenblieben, sondern die die Extreme in paralleler Anordnung um weitere 3—5% verschoben. Von Einzelheiten darf abgesehen werden, da nur das Prinzip zu beleuchten ist.

Da es nach obigem gelungen ist, die colorimetrischen Ansätze im Prinzip zu sichern, haben wir die störenden Faktoren zu erörtern. Wir berühren also einmal die reaktive Technik an sich. Wir gelangen aber gleichzeitig dahin, neben dieser die Einflüsse ins Auge zu fassen, welche dem zu prüfenden Cholesterin von der Isolierung her anhaften. Strenge Reaktionsbedingungen und reinstes Cholesterin geben die gewünschte Genauigkeit. Man hat also beide Gesichtspunkte zu trennen.

d) Wird in der den Vorschriften der Autoren (s. o.) nachgebildeten mittleren Präzision gearbeitet, so werden die Erträge von a, b, c nicht erreicht.

Gewiß haben manche Autoren auf Präzisierung gedrängt (s. o.), aber schon die Befunde von Fe x sprechen dafür, daß das Prinzip im Extrem niemals erkannt worden ist. Nur so sind die auf gute Literaturübersicht

¹⁾ Fe x zeigt Zahlenreihen in seiner Tab. IV mit dem Glaskeile, die cet. par. hierher gehören. Die Versuche Fe x ens (Tab. V), den Keil mit einem Reaktionsansatz (5 mg Cholesterin bzw. 1 mg Cholesterin auf 5,0 ccm Chloroform) zu färben, fallen bei unseren älteren Studien nach den Erörterungen der Einleitung fort. Wir sehen nach Abschluß unserer Arbeit keinen Anlaß, sie unter den extremen Bedingungen (a) nachzubilden. Fe x hat Fehler gezeigt bis zu 50%.

gegründeten scharfen Urteile dieses Autors überhaupt möglich. Wir haben durch jahrelange Arbeiten die Klippen schon früher erkannt und uns stets auf Präzision bezogen (Lit.). Trotzdem beweist die Arbeit von Fex, daß prinzipielle Klärung über die „mittlere“ Präzision heraus (die ja u. a. wohl auch noch den besseren und daher unverhältnismäßig kleinen Teil des breiten Kreises angewandter Untersuchungen darstellt) das nötigste Vorgehen auf diesem Gebiete ist.

Es handelt sich, kurz gesagt, weniger um die Fehlerbreiten an sich, als um die Fehlerhäufigkeit und um die Ursachen anomaler Färbungen und Versager, die sich mit reineren Befunden auch noch vermengen können. Es ist kein Wunder, daß anomale Endfärbungen bei durchgeführten Analysen zu Zweifeln lenkten, die meist viel zu leicht gewogen wurden. Den betreffenden Erscheinungen in reinen Lösungen ist nachzugehen, um mit Müllers und Fexens u. a. Zahlen zu Recht zu kommen. Die Tatsache einzelner Versager und weiterer „unbrauchbarer“ Ausfälle ist ein betrübendes Characteristicum dieser so weit verbreiteten, daher in vielen Ergebnissen zu bezweifelnden Methodik.¹⁾ An dieser Stelle, dem Übergange von extremer Strenge der Technik zu üblicher Präzision wird sich daher unser Vorgehen am besten einsetzen lassen.

Es wurden neue Gläser und Vorratsflaschen aus „hartem“ Apparatengläse (F. Z.) sorgfältig gewaschen, mit dünnem Ammoniakwasser warm stehen gelassen (2—3 Stunden), mit Papierbrei geschüttelt, warm, dann kalt gespült und 1 Tag mit dest. Wasser nach Spülen stehengelassen. Dann wurde in üblicher Weise mit reinem Dampfe aus reinen Glasleitungen gründlich gedämpft, mit heißem Papierbrei und dest. Wasser geschüttelt und gründlichst ausgewaschen, staubfrei abtropfen gelassen und ebenso getrocknet. In einzelnen Fällen wurde mit reinstem Alkohol gespült. Die Reagensröhrchen wurden später mit dem versuchsgemäßen Ansatz aus H_2SO_4 (s. u.), Acetanhydrid (s. u.) und Chloroform (s. u.) stehengelassen, dann wurde gereinigt. Es wurde die reinste erhaltliche Schwefelsäure (die auch frei von N-Oxyden war) in einer der reinen Flaschen, nachdem diese mehrfach

¹⁾ Häufig wurde ich in methodischer Hinsicht um Rat gefragt und habe dann im Interesse der Sache Prüfungen vorgenommen. Das Hellige-Colorimeter ist durch die handlichen, mindestens handlich scheinenden Methoden mit gewissem Rechte verbreitet. Es haben zahlreiche, methodisch nicht streng durchgebildete Untersucher sich der Vorschriften bedient. Dabei ist es ohne Verschulden der Autoren sicher zu einer Verflachung in der Handhabung und nebenher zu einer Überschätzung gekommen. Die Arbeiten mit den colorimetrischen Methoden Authenrieths haben Einfachheit an sich und sollen einem breiten Kreise dienen. Dabei ist aber Ablenkungen Tür und Tor geöffnet, weil auch eine klar und einfach gefaßte Anweisung, die von gereiften Arbeitern (z. B. Weston, 1916) anerkannt und im Prinzip bestätigt ist, Aufmerksamkeit und Kritik erfordert. Beim Cholesterin ist es speziell die Klippe des Vergleiches nuancefremder Ansätze. So haben die auf das Hellige-Colorimeter zugeschnittenen Methoden zwar zur Verbreitung chemischer Studien und zur Gewinnung mancher Befunde angeregt, aber auch verflachend gewirkt. In der Biochem. Zeitschr. 1920 wird in diffizilen Fragen über Blutharnsäure trotz der ersten kritischen Studien von S. R. Benedict (1915) und der so schwerwiegenden Angaben von O. Folin (System 1919) nach Authenrieth gearbeitet, dessen Technik mindestens überholt sein dürfte.

mit derselben Säure stehengelassen resp. gespült war, aufbewahrt. Hierfür diente eine Kappenflasche. Sinngemäß wurde bei Acetanhydrid verfahren. Es wurde nur reinstes Präparat verwendet, dasselbe sorgsam fraktioniert oder auch ein solches aus reinen Stoffen hergestellt. Chloroform ist u. E. (s. o.) sicher oft eine weitere Quelle der Störungen¹⁾ und wurde mit allen zu Gebote stehenden Mitteln gereinigt und entwässert, destilliert, in brauner Kappenflasche verwahrt und alle 2 Tage frisch hergestellt.

Die Reinigung der Schwefelsäure vorzunehmen und durchzuführen, ist mißlich. Es sind wirklich nur die allerbesten ad hoc geprüften Spezialpräparate herangezogen worden. Mehrfach wurden sie durch Zugabe von reinem SO_2 auf 100% gebracht. Schwefelsäure mit leicht gelblichem oder bräunlichem Stich ist überhaupt abzulehnen. Auch reinste Säure kann im Laboratorium beim Gebrauch diese Färbung annehmen (Staub). Es ist ganz verkehrt, Schwefelsäure aus der allgemeinen Flasche zu nehmen. Man zweige hierfür einen besonders qualifizierten Bestand ab, ebenso z. B. einen für Mikro-RN-Arbeiten. Nahezu sicher halte ich Spuren von SO_2 und N-Oxyden als Faktoren, die für sich oder im Ansatz störend wirken, ebenso wie ein Wassergehalt unter 98% sich bemerkbar macht. Von Acetylchlorid des Handels²⁾ ist bekannt, daß es Chloracetylchlorid enthält, das kann auf die Herstellung des Anhydrids wirken. Auch andere Begleiter, die für sich mit H_2SO_4 reagieren, kommen vor. Temperatureinstellung wurde durch Regulatoren gesichert.]

Bleibt man im Vorgehen nach a), so kann man, Chloroform variierend, cet. par. bereits Anwachsen oder sogar Häufung von Störungen sehen. Während im Gange a) die Mißfarben zwar ausbleiben, jedoch einzelne abweichende Treffer auftreten, so erscheinen hier aus der Reihe fallende Extreme und reichlich Mißfarben. Eben solches sieht man bei Einbringen weniger guter Schwefelsäure. Indes ist das Übersichtsbild nicht das von Müller eingesehene. Die Gesamtfehlerhöhe im Durchschnitt wird wohl größer, aber so ganz anomale Proben treten in mittleren Cholesterinmengen nach a) wenig auf, wohl bei den niedersten, kaum bei den höchsten. Die prozentischen Fehler bei letzteren steigen auf rund 8 bzw. auf rund 9 Je geringer der absolute Farbertrag (das reagierende Cholesterin), desto breiter und heftiger die Störung, welche in dichteren Medien überkompensiert werden kann.

Begibt man sich nun, schrittweise kombinierend, der einzelnen Präzisierung, so kommt man, immerhin noch wortgetreu nach den üblichen, nicht zu streng gefaßten Vorschriften, arbeitend, auf Trefferbilder aus Fehlererscheinungen, welche mit den Fexschen oder Müllerschen

¹⁾ Joh. Feigl und H. Meyer, Biochem. Zeitschr. 1, H. 4, S. 318. 1906. Die meisten Chloroformsorten des Handels, auch D.A.B.-Proben, hinterlassen Rückstände, die sich mit dem Reagensansatz bräunen. H_2SO_4 gibt vergilbende, oft sogar bräunliche Töne. Reinstes Chloroform ist kaum haltbar. Die Zersetzung wird durch Zusätze gehemmt. Auch diese und ihre Produkte sind gegenüber der Reaktion nicht indifferent. An die Zusammenwirkung mit den Verunreinigungen der Schwefelsäure knüpfen sich gewisse besondere Bedenken, weil bei Variation letzterer Chloroformverdampfungsrückstände verschieden reagieren.

²⁾ In organ.-präparat. Büchern, z. B. Hans Meyer, Analyse u. Konst.-Ermittlung, Berlin, Springer, betont nach V. Meyer und G. Goldschmiedt.

identisch werden können. Man kann also 20% bis 33% absolut anomale Proben sehen in mehr oder minder brauchbarer Umgebung. Bei Fe_x wäre noch nicht die Hälfte der Zahlen etwa brauchbar, daher sein Urteil, dem man auf dieser Basis beipflichten muß. Nun muß man (Lit.) zugeben, daß Fe_x sich am schärfsten und ungünstigsten über die Colorimetrie an sich (reine Lösungen; „Extrakte geben eher schlechtere Ausfälle“) äußert, daß die Mehrzahl kritischer Untersucher ein besseres Gesamtbild entwirft. Aber ebenso sicher ist — das muß nach meinen Erfahrungen unterstrichen werden¹⁾ —, daß nicht zu wenige Arbeiten in der einschlägigen Literatur von Untersuchern und Arbeitsstätten stammen, die an exakte Arbeitsmöglichkeiten, wie sie Fe_x bewiesenermaßen zu Gebote standen, nicht heranreichten. Mithin muß es Befunde und Urteile geben, die mit 33% und 50%, vielleicht im einzelnen mit reicheren Fehlern behaftet sind, ohne als solche aufklärbar zu sein. Also wird eine Literaturübersicht in der Verwertung von Befunden sehr pessimistisch vorgehen müssen. Fe_x urteilt nach seinen Ergebnissen mit vollem Rechte streng abweisend. Doch muß man aus der reichen Literatur die — nicht zu knappen — wesentlich besseren Urteile mancher Methodologen mit heranziehen²⁾. Diese kommen in der vergleichenden Prüfung der Methoden noch zur Geltung, auch ist betont worden, daß bereits die Prinzipien Weston (Salkowski) sowie Grigaut, Authenrieth, Bloor (Liebermann-Burchard) verknüpft mit den übrigen Einblick gestatten, und daß Versuche mit Cholesterinzugaben zu Serum hier verwertbar bleiben. Hier haben wir von den Leistungen auf seiten der quantitativen Gewinnung des Cholesterins abzusehen, dagegen dessen „Reinheit“ von Begleitern ins Auge zu fassen.

Es ist nach obigem gewagt, die anomalen Proben und die Einzel-extreme auf Grund eines oder der Summe einheitlicher Reagenzien erklären zu wollen, abgesehen von Fällen mit relativ geringem Cholesteringehalt. Man wird nur sagen dürfen, daß unreine Gläser (Einzelfälle), geringe Cholesterinquanten (engerer Kreis), unreine Reagenzien (Reihe mit Betonung einzelner), Meßfehler (Einzelfälle) in Konkurrenz treten können. Arbeitet man in üblicher Weise, so treten auch in reinen Lösungen, mehr noch in Extrakten, die mißfarbenen Proben auf. Sie sind den Untersuchern (s. o.) bekannt genug, zweifellos aber schon von Methodologen zu leicht gewogen worden. Vergleiche sind oft geradezu undurchführbar³⁾. Große Bedeutung erlangen sie erst in Extrakten, speziell bei Bloors Technik. Wo auf der einen Seite reaktiv und technisch Extreme außerhalb der Reihe (höchste Präzision), anomale Treffer (üb-

¹⁾ Fußnote s. oben.

²⁾ S. o. sowie in den Mitteilungen des Verf.s über Lipämie (I—VII).

³⁾ Einzelne Autoren haben angeraten, trotz der bräunlichen Beimischung den (noch als durchführbar bezeichneten) Vergleich anzubahnen. Man denke an die individuelle Einstellung!

liche Genauigkeit) vorkommen können, kommen auf der andern Produkte hinzu, die aus der zu untersuchenden (Blut-) Probe stammen, bei der Isolierung gebildet sind oder diese passiert haben. Es findet also eine Bereicherung der Fehlermöglichkeiten statt, die wahllos fallen und die sich verstärken können (Hebung des anomalen Charakters, der Nichtmeßbarkeit, gleiche Anzahl), oder die sich bei gleichartig bleibender Untauglichkeit in der Reihe ausbreiten (vermehrte Anzahl).

Dennoch hat man darauf hingearbeitet, Cholesterin tunlichst rein zu isolieren, und die irgend entstandenen Quellen der Mißfärbung auszuschließen (s. o., ferner u.) oder den Gesamtextrakt vorsichtig zu verarbeiten (Bloor). Mit diesen beiden Richtlinien ist auch unserer Arbeit Weg gewiesen, der aber auch darauf ausgeht, die Gesamtextakte auf Nichtcholesterin zu analysieren. Der Sprung von der energischen Spaltung zum schonenden Extrakt enthält noch andere reichere und entwickelbare Gedanken, als ihm von den meisten Methodologen beigelegt zu werden scheinen. Auch Weston, Myers, Fex gehen an dieser Stelle ertraglos aus.

Indem wir auf das Endurteil von Fex (Seite 115) hinweisen, sind wir gezwungen, was reine Lösungen und das Prinzip (die Prinzipien) angeht, einen ganz anderen Standpunkt einzunehmen. Unsere Zahlen geben ein anderes Bild als es Fex sah. Ob die Auffassung relativer Werte (Fex) sich in der Praxis der Colorimetrie umstreiten läßt, ist weiterhin zu entscheiden. Wir betonen, daß es möglich und immerhin gut erreichbar ist, colorimetrisch in reinen Lösungen exakt genug zu arbeiten. Wir betonen aber dabei, daß der Erfolg an strenge Voraussetzungen geknüpft ist, die, wenn schrittweise zur üblichen Genauigkeit eines laboratoriumstechnisch gut geschulten Arbeiters abgebaut, die Höhen und Häufigkeit der Fehler schnell steigen lassen, und die in der Hand weniger Geübter tatsächlich einen Charakter erlangen, der dem von Fex geschilderten noch nachsteht. Somit verlieren die Methoden im weiten Kreise angewandter klinischer Untersuchungen tatsächlich an Boden; die Ausführungen von Fex sind daher, wenn auf die richtige Stelle gelenkt, im Rechte. Wir können sogar einräumen, daß Technik, Gerät und Reagenzien eine bessere Beherrschung verlangen, als je betont worden ist.

II. Einzelne Vergleichsversuche an colorimetrischen Methoden, in reinen Lösungen durchgeführt.

a) Es wurden nach den Gesichtspunkten von a) zunächst die Liebermann-Burchardsche Probe und die von Salkowski in den Vorschriften von Grigaut bzw. von Weston als Reihenversuche einander parallel gestellt. Der Westonsche Ansatz ist in der angezogenen Literatur vom Autor selbst¹⁾ zuletzt (1916), auch von Henes²⁾ (1913) beschrieben wor-

¹⁾ l. c. Journ. of Biolog. Chem. **28**, 385. 1916/17.

²⁾ l. c. Arch. f. klin. Med. **111**, 125. 1913.

den, der von Grigaut ebenso von Henes¹⁾ und von Fe x. Die Sonderaufgaben der einschlägigen Technik wurden sinngemäß präzisiert.²⁾

b) Es wurde die Westonsche Vorschrift (IIa) mit der Liebermann-Burchardprobe im Sinne von Authenrieth-Funk präzisionscolorimetrisch verglichen.

c) Es wurden Bloors und Authenrieths Ansätze wie in b) verglichen.

d) Es wurde Authenrieths Vorschrift präzisionscolorimetrisch nach dem Entwicklungsprinzip mit dem festen vorher durchgeeichten Standard verglichen.

Es wurden Mengen verwandt, die den oben angegebenen Vorschriften, jeweils den Vergleich voll ausnutzend, entsprachen. Je 10 Analysen.

Über die Resultate läßt sich nun kurz so viel sagen, daß die unter Ia gewonnenen und dargestellten Bilder der Treffer (Extreme usw.) im einzelnen wieder herauskommen ohne wesentliche Änderung. Je nach dem wahllosen Ausfall der Parallelen fanden jedoch Kreuzungen statt. In Reihe a waren etwa 40%, in b 45%, in c sogar 52%, in d 47% Treffer dem Minimalbereich angehörig. D. h. in praxi findet man die Bilder der Einzelprüfung jeder Methode in den möglichen Permutationen wieder. Das heißt ferner, daß, abgesehen von gewissen technischen Abweichungen der Prinzipien (s. o.) die Methoden Übereinstimmungen geben, die durchaus befriedigend sind, und auf die weiterhin gebaut werden kann. Die höchste relative Unsicherheit findet man, wie vorausszusehen, da, wo die Änderungen gewichtig sind (Grigaut mit relativ hohem Cholesterin), und wo die übrigen die Minimalgehalte ihrer Technik haben. Darauf wurde oben hingewiesen. Ferner wurden die Parallelen sinngemäß gemustert mit entsprechenden Ergebnissen, die sich aus Ia erklären lassen. Eine Durchführung in ganzer Reihe wäre möglich, im strengen Sinne, wenn mehrere Untersucher, die gleichzeitig exaktest eingearbeitet wären, die entsprechenden Einzelmethoden gemacht hätten. Solche fehlten uns. Dadurch wäre die wortgetreue Handhabung in zeitlicher Hinsicht nicht voll garantiert gewesen, weshalb wir einstweilen von dieser Forderung Abstand nehmen. Die Methodik von Tschugaeff-Iscovesco ist auch hier eingesetzt worden. Das schon von anderer Seite und oben formulierte Urteil läßt eine Modifikation nicht zu³⁾. Wir be-

¹⁾ l. c., S. 126 mit Beispiel in Durchrechnung und ferner kurz bei Fe x. Henes arbeitet bei gleichem Vol. mit abgepaßtem Cholesterin, Grigaut nach dem Verdünnungsprinzip, welch letzteres zwar u. E. dem ersten nachstehen dürfte (s. o.).

²⁾ Herstellung und Behandlung und Messung des Verdünnungsgemisches (Mikrobürette).

³⁾ l. c. Henes (1913) S. 127ff. Originaltechnik. Urteile von Iscovesco und Defaye, sowie Stellungnahme von Henes. Zu letzterer ist zu bemerken, daß man auch der diffizilen reaktiven Technik bis zum gewissen Grade Herr werden kann. Acetylchlorid kann aus geeigneter Bürette entnommen werden. Zinkchlorid kann (mit Vorsicht) in Pastillenform gebracht werden (s. später).

tonen aber, daß die größere Farbtiefe eventuell besondere Verwendung nahelegt¹⁾. Als Parallelmethodik zum Liebermann - Burchard auf gleicher Basis betrachtet, ist diese Probe wohl entbehrlich; erst wenn man mehr aus ihr herausholen und sie auf Sondergebiete versetzen will, wird sich die höhere Farbtiefe bezahlt machen und Aufwendungen lohnen. Dabei wäre aber die Isolierungstechnik unter strengeren Kriterien zu beurteilen. Die Neuberg-Reuchwergersche Probe ist, so schön und typisch sie ist, *et. par.* noch nicht geprüft worden.

III. Reine Lösungen von Cholesterin werden den isolierenden (spaltenden, extrahierenden) Prozessen unterworfen und nach entsprechender Aufarbeitung colorimetrisch untersucht.

Es ist nicht von der Hand zu weisen, daß die eben genannten Eingriffe — abgesehen von den Erträgen unter dem Gesichtspunkte quantitativer Analysen — Faktoren erzeugen oder verändern, welche die colorimetrischen Methoden (Farbentwicklung, Farbtiefe, Farbnuance) von den prinzipiellen Befunden ablenken. Mindestens müssen in dem entwickelten Bilde diese Stufen an reinen Substanzen geprüft werden. Die Grundlinien der Isolierungsvorgänge sind oben unter Hinweis auf die einschlägige Literatur skizziert.

a) Bei Bloors Vorschriften kommen 3 Vol. Serum oder Blut (evtl. 2 Vol.) auf rund 100 Vol. Alkohol-Äther, absol. 3 : 1. Aliquote Teile dieser Reaktive werden eingeeengt. Es stehen dabei im allgemeinen 3,0 mg bis 10,0 mg „Gesamtcholesterin“ in Arbeit. Die aliquoten Teile sollen schonend eingeeengt, deren Rückstände zur Isolierung des Cholesterins mit Chloroform aufgenommen werden. Verunreinigungen der Reagenzien können dabei nicht nur im Abdampfrete, sondern aus diesem im Chloroform wiedergefunden werden. Wir haben 30 Proben käuflichen absoluten Alkohols der späteren Kriegszeit und letzten Jahre untersucht und sowohl bei der fraktionierten Destillation zwecks Reinigung wie auch bei direkter Anwendung das Übergehen von Stoffen in den Chloroformauszug beobachtet, welche insofern die Colorimetrie beeinflussen, als die Treffererteilung Ia sich in ungünstigeren Breiten hält. Allerdings waren die Abweichungen beträchtlich, und nur in 7 Fällen dürfte bei mittleren Cholesterinmengen der Vorschrift von glatten Störungen der Nuancen gegenüber beiden Ansätzen gesprochen werden. In zwei Fällen stammten die Stoffe mutmaßlich aus den Korken, doch konnte Altern am Lichte in gewöhnlicher Flasche (1 Jahr) erneut störende Faktoren wachrufen. Die Abartungen von Einzelproben lagen in Farbminderung (3 Fälle mit 7% Defizit gegen blinde Versuche) oder in Erzeugung von Mißfärbungen des so umstrittenen bräunlichen Charakters. Jedenfalls

¹⁾ Einzelheiten seien zurückgestellt.

konnte käuflicher Alc. abs. hierin mitwirken. Alkohol kommt ferner bei Weston und Kent in Betracht.

Käuflicher Äther (auch bester Marken) enthält Stoffe, die zu Störungen und selbst zu Schäden geführt haben, wie die Literatur der organischen Arbeitsmethoden reichlich nachweist, auch im Belange farbchemischer Vorgänge bei Gegenwart starker Reaktionsmittel. Peroxyde, ungesättigte Verbindungen, Aldehyd bilden sich auch in sorgsam gereinigtem Äther neu. Meist sind diese Begleiter flüchtig, wenn auch zum Teil höhersiedend als Äther selbst. Sie können zum Teil bei der Eindunstung nach Bloor erhalten bleiben, sekundär mit den übrigen extrahierten Stoffen reagieren und auch unabhängig davon ins Chloroform übergehen. Bei 20 Proben käuflichen (D. A. B.) Äthers und 20 Proben Narkoseäthers, ferner in 20 bzw. 20 Alterungsversuchen (Licht, Zeit 2 Monate bis 1 Jahr) käuflicher gereinigter Marken wurden Prüfungen angestellt. In 12, 5, 2 bzw. 8 Proben wurden im Vergleich zu blinden Proben Abweichungen beobachtet. Sie waren atypisch, nicht einheitlich nur auf Mißfärbungen hinauslaufend, auch Vertiefungen und Bläunungen (3 mal) bietend. Jedenfalls kann Äther Störungen (nicht streng übersichtlicher Art) zweifelsfrei einschleppen. Neben obigen Versuchen mit Alkohol allein und Äther allein konnten mit dem Bloorgemisch die Einzelstörungen beider in 85% der Beobachtungen wiedergefunden und somit zwingend als „störende, mißfärbende“, die Colorimetrie schädlich beeinflussende Faktoren erwiesen werden. Die Solvenzien sollen entsäuert sein.

Wenngleich anzunehmen ist, daß versierte Arbeiter auf reinste, sorgfältig fraktionierte Solvenzien sehen (wir haben seit Beginn unserer Arbeiten streng darauf gehalten, Prüfungen vorgenommen und Bloors diesbezügliche Hinweise sicherlich übertroffen, wie früher beschrieben), so ist doch nie die beobachtete Gefährdung auf seiten dieser Fehlerquelle gekennzeichnet worden. Das ist ein Grund zu unserer Annahme, daß manche Untersucher gewisse Anteile ihrer Fehlschläge in den Solvenzien der Apotheken und des Handels zu suchen haben¹⁾.

b) Natronlauge allein, wenn in besten oder mindestens besseren Marken verwendet, erzeugt mit Cholesterin allein (Authenrieth, Weston, Csonka, Weston-Kent kombiniert) kaum oder höchst selten farbstörende Vorgänge. Immerhin ist das Reagens sorgsam zu behandeln²⁾.

Folgt die Laugenbehandlung auf Einengung alkoholischer oder ätherischer oder gemischter Extrakte (Weston und Kent, Csonka), so wird in manchen Fällen nach IIIa die Ablenkung ausgelöscht, in wenigen gesteigert. Wird bei der Laugebehandlung Konzentration und Temperatur überschritten, so ist Verlust an Cholesterin erweislich.

¹⁾ Aus meiner Praxis weiß ich durch Anfragen und Raterteilung unverhältnismäßig viele Fälle dieser Art zu erwähnen. (Auch Anstaltsapotheken gaben Anlässe.)

²⁾ Wir bereiteten nach Bang (Mikromethoden der Blutbestandteile, Bergmann, 1916) höchstkonzentrierte Laugen, die sorgsam absitzen gelassen und verdünnt wurden.

c) Gips (Myers) entfernt farbbeeinträchtigende Faktoren der Solvenzien nach speziellen Versuchen nicht absolut. Kalkhydrat (Weston) und Bariumchlorid (Csonka) in den gegebenen Kombinationen sind von minderndem Einflusse.

Die genannten Stoffe (b, c) sind nicht in dieser Richtung maßgebend, aber sinngemäß hier zu prüfen. Man muß jedoch ins Auge fassen, daß sie mit präformierten (nativen) Produkten oder intermediär entstehenden Umsetzungen hervorrufen können.

Wie ersichtlich, komplizieren schon die einfachen Reagenzien unter Umständen den Vorgang in ganz reinen Lösungen. Es ist daher auf beste Präparate zu sehen. Solvenzien sind oft neu zu destillieren.

IV.

An nächster Stelle kämen Versuche, die mit Cholesterinzusätzen arbeiten. Indes hängt die Beurteilung von der Leistung der Isolierungsmethoden ab, welche natives und zugesetztes Cholesterin gleichmäßig erfassen sollen, was nicht von vornherein der Fall zu sein braucht, da ersteres in Protocholesteriden (Proteinbindung vermutlich physikalischer Art) festgelegt, aus diesen abzuspalten, und letzteres frei vorhanden ist. Für den Grundversuch (natives Cholesterin) treffen die noch später zu diskutierenden Verhältnisse zu, während der nächste (Summe) den Zusatz in einer von der Vorstufe unabhängigen Erscheinung bieten kann. Wir verweisen zunächst auf Westons und Myers Versuche (Tab. ders.) und stellen die Frage zurück.

V. Ergebnisse, mit den Gesamtmethoden gewonnen und vergleichend beurteilt.

In diese Frage an vorliegender Stelle einzutreten, ist Berechtigung vorhanden, da sich nach obigen Ergebnissen gezeigt hat, daß sich die colorimetrischen Prinzipien und Techniken letzten Endes gut beherrschen und zu parallelen Werten bringen lassen. In den einleitenden Ausführungen ist dargelegt worden, daß nur Bloor etwas anderes vorhat, als den übrigen Methoden vorschwebt. Letztere gehen darauf aus, Cholesterin („Gesamt“ in freiem Zustande) quantitativ und rein der Colorimetrie zu unterwerfen. Abgesehen davon, was die Methoden selbst aus den übrigen Rohstoffen des Plasmas an störenden Faktoren ergänzen, und was sie eventuell aus nativen Stoffen mit sich schleppen, müssen sie in der Bestimmung gleichwertige Ergebnisse liefern. Anders nach einleitender Darlegung Bloor, dessen Extrakt komplex ist und daher Belastungen für die Colorimetrie enthält.

Bloor publizierte seine Arbeiten von 1914 an in weiterer Entwicklung und gab schon 1916 einen reichen Überblick, dem „Fraktionierung des

Cholesterins“ (mit Knudson) 1917 folgte¹). Wir haben seit Beginn des Bekanntwerdens, gestützt auf vollständige Literatur und gründliche methodische Versuche das System übernommen und sind in einer längeren Folge von Untersuchungen immer wieder von dem eminenten praktischen Werte des Systems und der Brauchbarkeit der Einzelmethoden überzeugt worden. Auf unsere älteren Arbeiten (Feigl) kann daher wieder nur hingewiesen werden²). Vorweg sei bemerkt, daß Störungen, wie sie Weston so reichlich, und wie sie auch Müller wie Myers sahen, vorkommen können, daß man ihrer aber (s. o.) Herr werden und sie zu ganz vereinzelt Vorkommnissen machen kann. Wir haben gleich betont, daß Bloors Technik etwas anderes will, und daß man mit ihr vergleichend viel mehr herausholen kann. Danach richtete sich unser Vorgehen. a) Somit untersuchten wir typische Fälle pathologischen Bereichs quantitativ, vergleichend und dehnten solche Untersuchungen weitgehend aus. Mitgeteilt wurden bisher nur Zahlen von Extremen.

1. Ältere Befunde.

Tabelle I.

Gesamtcholesterin im Plasma nach Vergleichsanalysen.

I. Ältere Versuche bei Leberatrophie³).
mg Ges.-Chol. für 100 ccm.

Letale Fälle 2 und 3 (I und II Feigl und Luce 1917), Fall 5 (1917) und der geheilte Fall 4 (Feigl und Luce).

Fall- (Termin)	Gesamtcholesterin				Verteilung des Cholesterins	
	nach Authenrieth und Funk	nach Bloor	nach Gottler und Baker	nach Weston	verestert, bzw. freier Anteil in Prozent des Gesamtcholesterins nach Bloor und Knudsen	
2a	0,60	0,68	0,58	0,60	11	89
b	0,81	0,88	0,80	0,78	33	67
3a	0,48	0,56	0,40	0,47	11	89
b	0,66	0,75	0,60	0,70	50	50

¹) W. R. Bloor, Journ. of Biolog. Chem. **25**, 577—601. 1916; vollständige Lit.-Übersicht. System. Eigere Methode dess. Eberda **29**, 1—24. 1914 (Fett). Derselbe, eberda **22**, 133. 1915 (Lecithin). Derselbe eberda **24**, 227. 1916 (Ges.-Cholesterin). Derselbe (mit Knudson) eberda **27**, 107. 1916 (Mikrodigitonintechnik, getrennte Bestimmungen von Ch. und Ch.-Ester). Derselbe (mit Knudson) ebenda **29**. 1917 (pathochemische Ergebnisse über Ch.-Verteilung auf Ch. und Ch.-Ester). Siehe dazu auch, abgesehen von der einleitend gegebenen Mitt. W. Denis, Journ. of Biolog. Chem. **29**, 93/110. 1917 (Ergebnisse mit leicht modifizierter Bloortechnik).

²) Joh. Feigl, Biochem. Zeitschr. **86**, 1. Jahrg. 1918. S. 5 Beschreibung des Systems und seine Beziehungen. Darin Angaben (Lit. und Mitt.) über eigene Befunde am Gesunden, bei Anstrengungen, bei Avitaminosen, bei Ödenkrankheiten, Karenz. Ferner derselbe eberda **88**, 54. 1918, spez. S. 61, das. auch ältere Lit. (Klein - Dinkin u. a.). Erdlich derselbe ebenda **93**, 257 (Lipämie VI). 1919.

³) I. c. Biochem. Zeitschr. **86**, 16. 1918. Ferner Vergleichszahlen. Feigl, Biochem. Zeitschr. **90**, 173. 1918 (Lipämie IV, Diabetes), in Tab. Außerdem siehe ebenda Lipämie III (Cholämie und Tetanus) und Lipämie V (Alkoholismus).

Tabelle I (Fortsetzung).

Fall-Termin)	Gesamtcholesterin				Verteilung des Cholesterins	
	nach Authenrieth und Funk	nach Bloor	nach Göttler und Baker	nach Weston	verestert, bzw. freier Anteil in Prozent des Gesamtcholesterins	nach Bloor und Knudsen
4a	0,12	0,18	0,10	0,12	33	67
b	0,11	0,16	0,12	0,12	40	60
c	0,15	0,20	0,12	0,16	30	70
d	0,12	0,19	0,11	0,11	35	65
5a	0,15	0,23	0,15	0,13	31	69
b	0,17	0,26	0,18	0,18	40	60
c	0,48	0,56	0,42	0,50	20	82
d	0,88	0,96	0,90	0,82	25	75

Die Bewertung dieser älteren Zahlenreihe erfolgt an entsprechender Stelle.

2. Norm. (Neue Befunde an gesunden, guternährten Erwachsenen.)

Im Zusammenhange auch mit den einleitenden Darlegungen über Interferenten der Liebermann-Burchardprobe (Derivate von Lifschütz gewisse Gallensäurederivate, Wieland-Weil; neue Derivate von Lifschütz, 1920; ungeklärte Farbsteigerung; Nuancierung durch Interferenten) verfolgten wir zunächst folgenden Gedankengang, der sich entscheidend darauf stützte, daß Bloor ja einen komplexen, keinen spezifischen Cholesterinextrakt anstrebt und erhält.

Bloorwerte sind durchgehend höher als solche nach den anderen Methoden (Bloor, Feigl, Weston, Müller, Luden u. a.). Diese relative Erhöhung ist an pathochemischen Variationen zu prüfen und die Norm als Grundlage zu nehmen. Wir greifen hier, Einzelfeststellungen zurückstellend, deren Typisches heraus.

Tabelle II.

Gesamtcholesterin im Plasma nach Vergleichsanalysen.

II. Neue Materialien zur Norm.

Entsprechend mg Gesamt-Cholesterin für 100 ccm Plasma oder Serum¹⁾

	Nach Bloor	Nach Authenrieth-Funk	Nach Weston-Kent	Nach Weston	Nach Csonka
A. Im Mittel:					
a)	200,0—220,0	110,0—125,0	120,0—130,0	115,0—128,0	120,0—128,0
b)	220,0—250,0	125,0—142,0	128,0—150,0	123,0—145,0	125,0—145,0
c)	180,0—200,0	95,0—110,0	105,0—125,0	95,0—120,0	100,0—120,0
d)	250,0—300,0	138,0—170,0	148,0—180,0	142,0—175,0	145,0—170,0

¹⁾ Vgl. die beschreibend blutchemischen Studien von Feigl über RN-Gebiet. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **83**, VII. Mitt. 1918; Kreatinin (Mitt. I—IV), Biochem. Zeitschr. 1917—1920; Lecithin. Biochem. Zeitschr. 1918 und Angaben über Lipämiekomplex l. c. Ferner: Feigl, Arbeiten über Marschanstrengungen, Biochem. Zeitschr. 1916, 1917, Zeitschr. f. klin. Med. 1916 und noch unveröffentlicht (S. 119—192).

Tabelle II (Fortsetzung).

	Nach Bloor	Nach Authen- rieth-Funk	Nach Weston-Kent	Nach Weston	Nach Csonka
B. Im Extrem:					
a)	200,0—220,0	105,0↔130,0	116,0↔132,0	112,0↔130,0	110,0↔130,0
b)	220,0—250,0	118,0↔144,0	125,0↔157,0	120,0↔150,0	120,0↔148,0
c)	180,0—200,0	88,0↔136,0	100,0↔122,0	91,0↔123,0	96,0↔125,0
d)	250,0—300,0	132,0↔185,0	142,0↔195,0	129,0↔190,0	139,0↔180,0

Zur Tabelle selbst ist folgendes zu bemerken. Die Rubriken a, b sind nach Bloor (Befunde von Bloor und Feigl, s. Literatur) die Mittelbereiche des Vorkommens, müssen es cet. par. bei den anderen Autoren gleichfalls sein.

Material: Gesunde und gut beobachtete Rekonvaleszenten¹⁾. Die Technik war eine sorgfältige (I bis III, s. oben). Anzahl der Bestimmungen: a, b je 35; c, d 12 bzw. 9. — Mitteltreffer zwischen 80% und 76% der Reihen.

B. Extremtreffer 12% bis 25% der Reihen.

Die meisten Mitteltreffer, was also in deren Bewertung von Bedeutung ist, zeigen der Reihe nach Csonka (88%), Weston-Kent (85%). Dann folgen Weston (83%) und schließlich Authenrieth-Funk (76%). In den Mittelbereichen (a, b) sind die Mitteltreffer am dichtesten vertreten, aufgelöst gegeben aus obigen Durchschnitten zu 93% bis 82%. In den Grenzbereichen des Vorkommens (c, d) fallen die Mitteltreffer auseinander und verlagern sich in die Extreme, d. h. in diesen tritt die sonst enger geschlossene Parallelität zurück.

Prozentberechnungen — Authenrieth bzw. Weston-Kent bzw. Weston bzw. Csonka gegen Bloor — der niederen Werte nach den höchsten (Bloor) sind vermutlich nicht von unmittelbarem Interesse.

An mittelbaren Ergebnissen bietet die Tab. II A) zahlenmäßige Normalbefunde für Cholesterinvorkommen (als „gesamtes Cholesterin“) im Serum gesunder, erwachsener Personen mittlerer Lebensjahre. Die Auswertung erfolgt jedoch erst später, da die Geschlechter, das Alter usw., ferner auch hier nicht aufgeführte Einzeltreffer außerhalb der Schemata zu werten sind. Spätere Erklärungen beziehen sich auf die hier nach früheren summarischen Angaben detaillierte Übersicht.

B) Die Ergebnisse nach A lassen Charakteristiken der gewählten Methoden für die in A angeschnittenen Fragen zu.

C) Methodenkritische Urteile sind in der Auflösung der Tabelle implizite enthalten.

D) Dieselben ergeben — technisch bewertet — noch folgende Gesichtspunkte. Als die sichersten Verfahren — unter den Forderungen der Disposition I, II, auf reinstes Cholesterin hinarbeiten — haben sich

¹⁾ Vgl. Fußnote S. 220.

Csonka und Weston erwiesen. Auch sonst sehen wir bei diesen die konstantesten Werte. Weston und Kent geben im ganzen mehr „verteilte“ und auch sonst sowohl etwas höhere wie auch uneinheitliche Werte, was bei Sicherung der technischen Aufgaben und reaktiven Präzision im Isolierungsmodus begründet sein wird. Die Übereinstimmung, auch mit Authenrieth ist jedenfalls nicht schlecht. Einheitlich geben sie Zahlen, die gegen Bloor beträchtlich abfallen. Trotz sorgfältiger Ausführungsformen kommen „Versager“ (incommensurable Minima) in strenger Bedeutung vor bei Bloor, prozentisch für die Reihe angegeben, 9, bei Authenrieth-Funk 8, bei Weston-Kent 6, bei Weston 3 und bei Csonka 4. Wenn auch andere Reihen diese Zahlen im einzelnen verschieben können, das Prinzip ist ersichtlich und unseres Erachtens beweiskräftig, weil alle Bestimmungen im Präzisionsinstrument einheitlich gemacht wurden, und für Authenrieth sonach das Keilinstrument fortfiel. Es sei hinzugefügt, daß speziell bei Bloor für praktische Zwecke gut noch 6 Bestimmungen, bei Authenrieth noch 4 hätten gerettet werden können (cet. par. bei den übrigen), das aber das Prinzip verfolgt wurde. Nach obigem steht die einfache Hydrolysentchnik Authenrieths also den übrigen nach, während Bloor nach den gegebenen Voraussetzungen für sich beurteilt sein will. Die Tatsache der relativ hohen Werte nach Bloor stimmt mit den Urteilen anderer Methodologen überein.

Über die sonstige Beschaffenheit der Normalform obiger Reihe ist, da Anknüpfungen geboten scheinen, noch zu sagen, daß nach derzeit konsolidierten, z. B. mikrochemischen Methoden bestimmt¹⁾ und normal befunden wurden: Dichte, Gesamteiweiß; Albumin-Globulin (in einigen Fällen); RN mit U_r^+N , Amino-N; U_r^- ; Kreatinin-Kreatin (in vielen Fällen); Ammoniak, meistens; Acetonkörper²⁾ seltener; Zucker; NaCl, P-Verteilung, wenigstens teilweise oft; H-Ionenkonzentration³⁾; Bicarbonat³⁾; Lipämiekomplex³⁾; Farbstoffe und Chromogene⁴⁾, die normal waren, spez. hinsichtlich des Bilirubins („Spuren“, Hymans v. de Bergh, Feigl und Querner). Die Einzelgebiete sind für die vorliegende Aufgabe, der Ausdeutung des komplexen Extraktes Bloors wichtig.

In Tab. I ist ein wichtiges Gebiet angeschnitten und kurz skizziert worden. Die Tabelle enthält nun leider komplexe Verhältnisse, die in Entwicklungsstufen liegen und Cholämie zum Teil hohen Grades mit Hypercholesterinämie achtbarer Beträge verbinden. Doch sieht man in mehr als einem Falle, daß mit steigendem Cholesterin die Abstände zwischen Bloor und den spezifisch isolierenden Methoden sich herabmindern, während Mittelzahlen Übergänge enthalten. Die Tabelle wäre derzeit nur Vorarbeit und in späteren Untersuchungen scheiden

¹⁾ Vom Verf. in entsprechenden beschreibenden Studien (RN-Gebiet nebst Gliedern u. a.) auch pathochemisch, hier interessierend spez. das Lipämiegebiet, befolgt.

²⁾ Besonderen einschlägigen Spezialfragen bei gegebenem Anlasse dienend.

³⁾ System Bloors mit Einschluß der Studien von F. A. Csonka, Journ. of Biolog. Chem. 1918, 1920 beschreibend und methodisch benutzt.

⁴⁾ Joh. Feigl und E. Querner, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 1919. IX.

wir, gefördert durch Erfahrungen über Bilirubinämie bzw. Cholämie¹⁾ zwischen zwei Gebieten — Hypercholesterinämie in weiteren Kombinationen mit normalen Bilirubin — und in gesteigerte cholämische usw. Formen — zum Zwecke der Aufklärung dieser Zahlen.

Normalbilirubinämische Hypercholesterinämie kann mit sonstigen Faktoren gepaart sein; fast stets sind Fette und Lipide gemeinsam gesteigert, in denen nur Phosphotid nachhinken kann.

3. Hypercholesterinämie ohne Bilirubinämie.

Tabelle III.

Gesamtcholesterin im Plasma nach Vergleichsanalysen.

III. Hypercholesterinämie bei Diabetes mellitus, A.

Wir bringen Zahlen aus unserer, auch von Fex übernommenen Arbeitsserie bei diabetischer Lipaemie (Lipaemie IV). Die dortige Tabelle III, Seite 208 enthält u. a. folgende Zahlen, fallend angeordnet.

Gesamtcholesterin in mg für 100,0 ccm Plasma (Serum).

Nr. (Original)	Bloor	Authenrieth-Funk	Weston (Salkowski)
11b)	1350,0	1260,0	1280,0
10	1280,0	1200,0	1160,0
8b)	1410,0	1350,0	1340,0
6	1200,0	1200,0	1180,0 (Bil.) ²⁾
4	1100,0	1180,0	1050,0
5	920,0	920,0	830,0 (A.-F. gestört) ²⁾
3a)	870,0	800,0	820,0
7	800,0	780,0	490,0 (A.-F. gestört) ³⁾
1b)	820,0	—	680,0 ²⁾

Dasselbe fortgesetzt aus Tab. II, S. 206.

8	790,0	720,0	720,0
12	740,0	700,0	700,0
14	690,0	660,0	650,0
7b)	670,0	610,0	620,0
5c)	620,0	540,0	550,0
16b)	570,0	520,0	510,0
5b)	500,0	460,0	465,0
4	510,0	420,0	440,0
3b)	420,0	380,0	370,0
3a)	410,0	340,0	350,0
1b)	340,0	290,0	300,0
16a)	390,0	300,0	300,0
1a)	310,0	220,0	230,0

Dasselbe fortgesetzt aus Tab. I, S. 202.

25	180,0	120,0	110,0
23	280,0	200,0	200,0
7	280,0	210,0	—

¹⁾ Joh. Feigl und E. Querner, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. IX. 1919.

²⁾ Authenrieth-Funk zerstört und geschätzt.

³⁾ Im Original, Biochem. Zeitschr. 90, H. 3/4, S. 208. 1918; Tab. III, Lfde. Nr. Zeichen I. Ma. b. sinnstörend 1680,0 statt richtig 680,0.

Tab. III lehrt für die aufgeführten Bestimmungsformen, daß der relative Abstand zwischen Bloor und den isolierenden Methoden, mit steigendem Cholesterin proportional sich verringert bis zu nahezu gleichbleibenden Werten hin. Meist steht Bloor mit gewissen Überschüssen, die aber gegen die Norm verschwindend sind, voran. An das Ausdeuten dieser Überschüsse knüpfen sich spätere Erörterungen. Mit fallendem Cholesterin tritt — man kann beinahe sagen abgestuft — der Abstand immer mehr hervor, bis er sich den Verhältnissen der Norm anpaßt und in deren Zahlenbildern verschwindet. Zur Ergänzung seien hypercholesterinische Lipämiebilder bei Diabetes mellitus, auch sonst noch (s. o.) vergleichend untersucht, beschrieben. In Tab. III sind alle colorimetrisch nicht eindeutigen Bloorwerte aus den Originalien ausgeschaltet.

Tabelle IV.

Gesamtcholesterin im Plasma nach Vergleichsanalysen.

IV. Hypercholesterinämie bei Diabetes mellitus, B.
mg Gesamtcholesterin in 100 ccm Plasma.

Bloor	Weston-Kent	Weston (neu)	Csonka	Authenrieth-Funk
1220,0	1170,0	1120,0	1110,0	1135,0
1050,0	940,0	930,0	940,0	940,0
1010,0	920,0	900,0	895,0	905,0
940,0	880,0	860,0	850,0	835,0
846,0	778,0	760,0	770,0	755,0
780,0	670,0	660,0	650,0	665,0
695,0	600,0	585,0	590,0	560,0
520,0	480,0	440,0	420,0	430,0
460,0	380,0	350,0	355,0	360,0
450,0	330,0	335,0	320,0	325,0
410,0	320,0	306,0	315,0	—
370,0	285,0	—	260,0	—
350,0	260,0	245,0	—	235,0
310,0	190,0	170,0	175,0	166,0
300,0	170,0	155,0	150,0	—
280,0	153,0	145,0	—	—
260,0	140,0	—	138,0	—

Über Tab. IV im Vergleich zu Tab. III ist zu sagen, daß erstere an absoluter Präzision überlegen ist und methodisch so scharf wie möglich genommen wurde, während III darin um etwas zurücksteht. Tab. IV steht im Einklang mit den Befunden der Tab. III. Beide Reihen von Ergebnissen lassen sich diskutieren. Zur Methodik ist (Literatur, s. o.) zu bemerken, daß die relativ großen Mengen unter Umständen in der Extraktionsleistung gefährdet gewesen sein konnten. Tab. IV sind in dieser Hinsicht Zahlen, die exakt genommen wurden, da nach üblich genauen Versuchen schon Anhalte da waren. Es wurden die Vorergebnisse eingestellt und nach ihnen modifiziert. Original-Bloor wurde nicht nach 3 : 100 (Vorschrift).

vielmehr 1 : 100 angesetzt, über 500,0 mg Cholesterin sogar 1 : 200. Letztere beide stimmten überein. Ebenso wurde auch in den anderen Methoden vorsichtiger isoliert und extrahiert. Es darf gesagt werden, daß beim Original-Bloor zwar nicht entscheidend, aber doch eher als bei Authenrieth, Weston (neu), Csonka Gefährdung der Erfassung eintrat. In diesem Sinne will daher unter Umständen die alte Tab. III in hohen Reihen etwas vorsichtiger beurteilt werden. Im technischen Kreise bleibend, sei gesagt, daß alle colorimetrisch nicht einwandfreien Zahlen (durch die Horizontale der Tabelle hindurch, also wo immer auftretend) ausgemerzt wurden. Bloorzahlen waren nach den Arbeiten zur Tab. IV in 8% kritisch gewesen, in 4% geradezu unbrauchbar. Technisch und zugleich systematisch wichtig sind unseres Erachtens dagegen folgende Verhältnisse. Diabetische Hypercholesterinämie existiert in verschiedenen blutpathochemischen Bildern. Man hat sie beobachtet (Literatur, Lipämie IV) mit sehr variantem „Gesamtfett“ von hohen zu relativ geringen Beträgen. Sie kann mit hohem „Blutzucker“ (0,8%) einhergehen, andererseits fast normalen zum Begleiter haben. Acetonkörper können gehäuft und der Norm genähert vorkommen. Es kann Hydraemie vorliegen. Alle diese Variationen sind, speziell in Tab. IV, gleich behandelt und voll vertreten mit Ausnahme jeder pathologischer Bilirubinämie und irgend beträchtlicher Xanthose (Beumer, Bürger, 1919). Es darf daher, ohne tiefere Bedenken, gesagt werden, daß genannte Stoffe keine größere Rolle im Liebermann-Burchard spielen.

Immerhin sind diese Hypercholesterinämiefälle blutchemisch komplex geartet, so daß nach anderen Umschau zu halten war (künstlicher Cholesterinzusatz, der auch methodisch bedeutungsvoll ist; Weston, Myers; cholämische Hypercholesterinämie; Verdauungslipämie; Hypercholesterinämie bei Nierenkrankheiten, Stepp). Die an dieser Stelle geforderten Aufgaben folgen weiter unten.

An Ergebnissen ist zu nennen: A. daß diabetische Cholesterinzahlen gewonnen wurden, daß B. im Methodenkreise Vergleiche angebahnt und erweitert wurden, C. daß die Leistungen der Methoden gleichwertig gemacht, sie bezüglich den extremen Verhältnissen ohne große Kunstgriffe angepaßt werden können, und daß die Methoden sich innerhalb gewisser Grenzen technisch verschieden ausweisen, D. daß mit steigendem Cholesterin die Werte der komplexisolierenden und rein isolierenden Methoden sich nähern. E. daß technisch-colorimetrische Störungen unter den blutpathochemischen Vorbedingungen nach Art und Häufigkeit von der Norm wenig abweichen.

Bei den erhöhten „Gesamt“-Cholesterinzahlen nähern sich Werte nach Bloor denen nach den anderen Autoren. Nehmen wir für die beschreibend-chemisch eingeordneten Normalfälle den Abstand — ohne Feinheiten im Mittel zu 70,0 bis 100,0 mg „Cholesterin“ an, so bleibt

dieser Abstand unter den zu IV gegebenen Ergänzungen im großen ganzen erhalten, soweit hier geurteilt werden darf.

Leichte Gelegenheiten zum Beweise waren gegeben mit dem Zusatz von Zucker, Aceton, Salzen, Neutralfett zu Plasma (s. auch unten). Dasselbe behielt — Gesamtcholesterin zwischen 200,0 mg und 300,0 mg (Bloor) mit Zucker bis 0,5%, Aceton bis zu 0,01% usw. im Arbeitsgange nach Bloor, Weston, Csonka, seine nativen Werte durchaus bei. Doch sind gehäufte Zusätze technisch aus zwei Gründen — „Bräunung bei nicht vorsichtigem Eindampfen und damit Entwertung der Analyse (Bloor, Feigl, Weston) und Festhalten des Ch. beim Aufnehmen mit Chloroform — immerhin, ob artifiziell, ob nativ, mögliche Anlässe zu Fehlern.

Bang hat in seiner letzten Lebensarbeit, den Lipämiestudien, bewiesen, daß Nahrungslipämie und Hypercholesterinämie nicht immer zusammengehen, daß man aber experimentell solche Bilder schaffen kann¹⁾. Wir ahmten einen seiner Versuche²⁾, diesen zugleich bestätigend, nach und fanden das „Gesamtfett“ im Plasma zu einer Frist verfünffacht, Cholesterin auf das 2fache gehoben bei sonst unwesentlichen Befunden (s. o.). Blutzucker leicht erhöht (+ 15%). In diesem Falle — 3 Analysen, parallel nach Tab. IV — wurde der Befund typisch für obige Reihe und ihre Ausdeutung erhoben.

4. Hypercholesterinämie kompliziert durch Bilirubin (Cholämie).

Die nächsten Aufgaben leiteten sich aus den Befunden der Tab. I her³⁾. Es gibt Fälle von sogen. katarrhalischem Ikterus⁴⁾, die schon sehr starke Bilirubinämie (noch vor erkennbarem Hautikterus, Feigl und Querner) in ganz kurzfristigem Anfluten bei noch nahezu oder tatsächlich normalem Cholesterin zeigen (Tab. V). Solche Entwicklungsphasen und die nächste Stufe — gut einwöchige schwerste Cholämie mit desgl. Hautikterus und leicht normalem Cholesterin (Tab. VI) — sind zu fassen und chemisch zu beschreiben. Übrigens bekommt man ferner nach obigen Verkettungen (Ikterus erst nach Bilirubinämie), besonders in chronischen Leberkrankheiten Kombinationen zu Gesicht, die Cholesterin, Bilirubin, Ikterus (dieser eventuell abklingend) zugleich erhöht zeigen (Tab. VI). Man kann auch solche Stufen festhalten, in denen Bilirubin absinkt und Cholesterin erhöht bleibt. Interessant sind obige, oft hoch hyperlipämischen und stark hypercholesterinämischen Fälle durch den Zustand der Maskierung des Fettes und der Lipämie. Er kann ungezwungen nur mit Gallensäuren im weitesten Sinne erklärt werden⁵⁾. Unsere langfristigen und gesichteten Materialien lassen uns folgende, als richtig vorausgesetzte Punkte in genügender Anzahl herausgreifen, die wir hier schon schematisieren dürfen.

¹⁾ J. Bang, Biochem. Zeitschr. 1918, s. auch bei Joh. Fex l. c.

²⁾ Hier nur kurz beschrieben.

³⁾ S. dazu Feigl und Querner l. c.

⁴⁾ Diesbezügliche Ansichten und Befunde von J. Bang in der Kritik und Beleuchtung von Joh. Feigl, der sich auf seine älteren Studien (Lipämie III, Cholämie) l. c. stützt. Biochem. Zeitschr. 1920.

⁵⁾ l. c. ⁴⁾ sowie Lipämie VI.

Tabelle V.

Gesamtcholesterin im Plasma nach Vergleichsanalysen.**V. Katarrhalischer Ikterus im ersten Anfangsstadium.**

mg Gesamtcholesterin: („Gesamtfett“); in 100 ccm Plasma (Serum).

Lfd. Nr.	Ikterus	Bilirubin	Gesamtfett	Gesamtcholesterin				
				Bloor	Authenrieth-Funk	Weston-Kent	Weston (neu)	Csonka
1	mäßig	+++	0,92	318,0	160,0	172,0	163,0	159,0
2	„	+++	0,85	279,5	145,0	153,0	142,0	143,0
3	„	++	0,71	224,2	115,0	121,0	118,0	115,0
4	erheblich	+++	0,58	263,0	121,0	119,5	117,5	116,0
5	Spur	+++	0,66	200,2	99,5	102,0	101,0	98,2
6	licht	++	0,62	206,0	110,0	112,0	108,0	106,6
7	fast 0	+++	0,70	269,0	132,0	140,0	135,0	130,0

Bem.: Ikterus ist erst spurweise herausgebildet bzw. besteht seit 1 Tag in der angegebenen Stärke bzw. längstens 3 Tage (1 mal).

Bilirubin in den Graden nach Feigl und Querner l. c. Außer +++ gibt es sehr selten noch die Stufe max. Die Fälle enthielten typisches „Stauungsbilirubin“.

Gesamtfett („Total ether soluble“ nach Bloor) oberste Norm (nüchtern) 0,85 g (s. auch Feigl), N 2 ein Grenzwert. N 6 leicht erhöht.

Die sieben Zahlenreihen der Tab. V sind kolorimetrisch einwandfreie Parallelen. Cholesterin ist, abgesehen etwa von N 1 (Grenzfall), überall normal. Die Abstände zwischen Bloor und den „rein isolierenden“ Techniken können, soweit Materialien in den Beziehungen der Norm

Tabelle VI.

Gesamtcholesterin im Plasma nach Vergleichsanalysen.**VI. Katarrhalischer Ikterus, einige Zeit bestehend.**

mg Gesamtcholesterin; („Gesamtfett“); in 100 ccm Plasma (Serum).

Lfd. Nr.	Ikterus	Bilirubin (Cholämie)	Gesamtcholesterin				
			Bloor	Authenrieth-Funk	Weston-Kent	Weston (neu)	Csonka
1		++	362,5	—	189,0	175,0	176,0
2		++	422,0	198,0	212,2	—	—
3		+++	345,3	167,0	178,0	169,0	167,2
4	durchweg	+++	287,0	149,0	146,0	141,2	140,0
5	stark	+++	456,2	220,0	216,2	—	206,0
6	bis	+++	502,0	395,2	409,5	397,5	394,2
7	sehr stark	+++	295,0	140,0	138,0	132,2	131,8
8		+++	368,0	155,0	—	—	150,5
9		maxim.	485,2	214,0	221,0	209,0	207,0
10		maxim.	306,0	146,0	152,0	147,0	145,2

Bem.: S. Tab. V. Gesamtfett in der Reihe der laufenden Nr. 0,92; 0,97; 1,41; 1,27; 2,28; 5,31¹⁾; 2,17; 4,31; 3,32; 8,82¹⁾.

1) Nicht vollständig maskiert.

vorliegen, wohl fast ausnahmslos für vergrößert gelten, so daß der Schluß gerechtfertigt ist, daß blutpathochemische Bilder vorliegend charakterisierter Art vom Bilirubin aus Abweichungen auf das Cholesterin übertragen. Besser wäre, von den bereits übergetretenen Gallenprodukten zu reden, die nach B a n g schrittweise durch Entmischung der Galle auf den Wegen verschiedener Permeabilität getrennt erscheinen können. Cholesterin ist — abgesehen von 1 — wenigstens nicht als erhöht anzusehen.

Tab. VI bietet dasselbe Bild wie Tab. V. Die sichersten Zahlen sind Weston (neu) und Csonka, Authenrieth tritt technisch (Beifärbungen) etwas zurück, wie auch manche Abweichungen zeigen. Im übrigen ist hier bei maximaler Bilirubinämie (Cholämie VII, Maskierung!) der relative Abstand Bloors gegen die übrigen markant genug gegeben. Bilirubin ist hier rein von „Stauungstyp“.

Tabelle VII.

Gesamtcholesterin im Plasma nach Vergleichsanalysen.

VII. Chronische und subchronische Zustände mit maskierter Lipämie und Cholämie¹⁾.

mg Gesamtcholesterin; („Gesamtfett“); in 100 ccm Serum.

Lfd. Nr.	Ikterus	Bilirubin	Gesamtfett ²⁾	Gesamtcholesterin				
				Bloor	Authenrieth-Funk	Weston-Kent	Weston (neu)	Csonka
1	stark,	++	5,28	682,0	—	538,0	531,5	529,0
2	seit län-	++	3,82	567,0	470,0	472,0	470,0	468,0
3	gerer oder	+++	6,67	789,0	656,0	682,0	676,8	675,0
4	langer	+++	8,92	993,0	833,0	872,0	862,0	857,2
5	Zeit	max.	7,53	1045,0	939,0	931,5	927,2	925,8

Obige Tabelle, zu der noch andere Zahlen hinzukommen, zeigt, daß Weston (neu) und Csonka die konstantesten, untereinander am besten stimmenden Zahlen geben, und daß Authenrieth-Funk auch hier offenbar nicht so sichere Anhalte bietet. Im übrigen sind, wie in den vorstehenden Tabellen über cholämische Zustände, auch hier Verhältnisse ersichtlich, in denen der relative Abstand Bloors sich ausprägt. Von einer Proportionalität oder gar Konstanz des Überschusses ist — auch nach den übrigen nicht aufgeführten Zahlen — nicht die Rede. Es müssen also zwischen den geschilderten Stufen stauungsbilirubinämischer Fälle Differenzen bestehen, die in den Werten für Bilirubin selbst nicht eingeschlossen liegen können. Es ist an die Cholate zu denken (Cholämie), die aus der Maskierung geschlossen werden dürfen. Bilirubin und Cholate können in wechselnden Beziehungen vorliegen, auch beim Eintreten oder

¹⁾ Pathologische Angaben u. E. an dieser Stelle irrelevant.

²⁾ Stets klar maskiert.

der stufenweisen Erzeugung ikterischer Zustände von der Gallenblase oder Leber her einander folgen. Die obigen Bloorzahlen waren frei von Störungen in der Colorimetrie. Doch kann — abgesehen von obigen Ausdeutungsversuchen — betont werden, daß auch bei den cholämischen Komplikationen unter steigenden Gesamtcholesterinwerten sich die Methoden nähern, wobei also zum Teil der relative Fehler geringer wird. Es gibt, in den Fällen der Gruppe VII auch solche, die noch Ikterus und pathologische Bilirubinämie (Cholämie) zeigen, dabei aber den relativen Abstand (Beitrag zur Liebermann-Burchardprobe durch Gallenstoffe schlechthin) verringern, so daß die diabetischen Cholesterinämievergleiche sich hier ähneln. Es würde ein nötiges Glied der Beweisführung sein (was schon Feigl und Querner betonten), Gallensäuren nachzuweisen. In den gegebenen Arbeitsverhältnissen sind wir mit Anläufen nicht zum Ziele gekommen; da es ja nicht die primären Gallensäuren sein müssen, welche wirklich nach Liebermann-Burchard reagieren, da außerdem der Farbstoff mit in Rechnung zu ziehen ist, und da wir an eine gesicherte Beteiligung der Gallensäuren in den Seren sonst zu glauben berechtigt sind, dürfte die Frage vorderhand zurückgestellt werden.

Es gibt Fälle, in denen erweislich ist, daß nach abgelaufenem Ikterus und bei fast verschwundener Bilirubinämie (Cholämie) Gesamtfett gesunken und Cholesterin noch in relativ hohen Werten vorhanden ist. In solchen, auch früher beobachteten Stadien stellen sich Verhältnisse der Norm oder diabetischer Cholesterinämiebilder her. Wir können — im Zusammenhang mit den Tab. V, VI, VII und im Vergleich zu den angezogenen Bildern — das dartun für Gesamtcholesterinwerte (8 Fälle) von 488,0 mg bis 722,0 mg (Bloor).

Die meisten ikterisch-cholämischen Bilder sind aber nebenher blutpathochemisch abgeartet (vgl. Lipämie III, loc. cit.): Zucker, RN-Stoffe u. a.

Ikterische bzw. cholämische Seren nehmen in der Cholesterinbestimmung nach Bloor vergleichsweise eine Sonderstellung ein. Die Ursachen der erhöhten Werte sind komplexer Natur.

5. Hypcholesterinämie.

In den methodischen Vergleichsanalysen haben wir bisher folgende Verhältnisse eingehend beschrieben: Norm, Hypercholesterinämie allgemeinen und hyperlipämischen (speziell diabetischen) Charakters, Hypercholesterinämie (verschiedener Typen) cholämischen (stauungsbilirubinämischen) Charakters, normale Cholesterinämie kompliziert mit hochgradigem Ikterus und Bilirubinämie (Cholämie). Gründe, die Idee der Bloorisolierung sachlich und technisch gegenüber den Reinisolierungen anzufechten, haben wir nicht zwangsweise anzuerkennen. Sie greift aber über den Kreis des Cholesterins unter Umständen beträchtlich

hinaus und muß daher unter die von uns eingangs betonten Gesichtspunkte gestellt werden. Meistens werden die Abweichungen mit steigendem Gesamtcholesterin (relativ) geringer, so daß sich in der Mehrzahl die Befunde nach den Analysen beider Richtungen nähern.

Wir haben gesehen, daß die Bloorwerte in der Norm beträchtlich höher sind als die „reinisolierten“ Befunde. Unter den Anschauungen des Teiles I dürfen wir Bloorzahlen zunächst einmal als Cholesterin selbst diskutieren. Dort liegt der Bereich zwischen 200,0 mg und 300,0 mg (Mitte 240,0 mg bis 250,0 mg) für 100,0 ccm Plasma gesunder, gut ernährter Erwachsener. Die Spannung ist relativ, wenn überhaupt, auch nicht wesentlich größer, als sie in den Werten der Reinisolierung gefunden wird.

Da nun einem normalen Gesamtcholesterin ein mehrdeutiger Zuwachs entstehen kann (unkontrollierbarer Farbzuschlag, Bilirubin, Cholate in Derivaten, Derivate des Cholesterins von Lifschütz, Oxydate und Polyoxydate), der für einzelne pathochemische Bilder demonstrierbar ist, so ist hierdurch die Frage der Hypocholesterinämie in eine kritische Stellung gerückt. Die Hypocholesterinämie kann absolut sein (Ch. unter die Norm sinken bei sonst noch normalem Lipämiekomplex), sie kann relativ sein durch deutlichen Abfall gegen die übrigen Konstanten und durch Zurücktreten gegen die Interferenten der Liebermann-Burchardprobe.

In gewissen Stadien der Kriegsunterernährung haben wir bei jämmerlich herabgekommene Individuen (ohne Ödem) als Ausdruck langer Inanition Neutralfett, selbst Lecithin (das sonst relativ konstanteste Glied des Lipämiekomplexes), Gesamtcholesterin und dessen Esteranteil belanglich absinken sehen. Letzteres konnte auf $\frac{2}{3}$ — $\frac{3}{4}$ des Fußpunktes der allgemeinen Norm fallen. Gewisse weitere Störungen der Blutzusammensetzung machten strenge Befunde nötig. Solche konnten bei Hypocholesterinämie streng nur nach Weston (neu), Csonka und durch Digitonin erzielt werden. Auch Authenrieth befriedigte nicht immer, wozu noch gehäufte Störungen kamen. Bloorwerte waren in manchen Beispielen verschleiert, in einigen immerhin, bei guter Kenntnis sonstiger Leistungen der Methode an sich, ev. verwendbar. Die Schwierigkeit in der Erklärung solcher Hypocholesterinämie lag meistens nur in der bloßen Abgrenzung gegen die Norm. Eben das zwang aber doch zur Gewinnung von Zahlen, die frei von Interferenten sein, also *cet. par.* möglichst Cholesterin selbst enthalten sollten.

Nach Csonka und Weston (neu) kamen Werte von 50,0 mg bis 75,0 mg häufig in 100,0 ccm Plasma vor.

Ungünstiger liegen nun solche Fälle, in denen gesenktes „Gesamtcholesterin“ im Milieu mit größeren Mengen echter Interferenten zusammentrifft. Das sind z. B. jene hämolytischen Zustände (h. Icterus), die anhepatisches Bilirubin im Serum enthalten, und die in gewissen Phasen gerade als Hypocholesterinämie, oft unweit des Fußpunktes der Norm, und zudem kompliziert durch hohe Esterquote und erhöhte Befunde über Gesamtfett, zu charakterisieren sind. Dabei wirkt der (nicht

analysierbare) Zuschuß zum Grade der grünen Liebermann-Burchard-Phase verwischend. Tatsache ist denn auch, daß manche Fälle und Stadien aus dieser Reihe, ohne typisch zu sein, mit den Kenntnissen aus Tab. V charakterisiert und verglichen werden können. Man findet den Abstand zwischen Bloor einerseits, Weston und Csonka andererseits in gewissem losen Zusammenhange mit den Bilirubinämiegraden über die Norm hinaus erhöht und tut gut, sich für strittige Fälle an die Vergleichsuntersuchung zu halten.

Angesichts der Tatsache, daß Gallensäuren mikrochemisch für uns nicht genügend genau bestimmbar waren, ist auch diese Kombination (die ja in dem Erscheinungskomplex der anhepatischen Bilirubinämie von höchstem Werte sein darf) nicht weiter analysierbar. Von der Auf-führung geeigneter Zahlenreihen möchten wir, da es sich um anderen Orts diskutierte methodische Argumente handelt, absehen.

6. Cholesterin in farbstoff- bzw. chromogenreichen Seren.

Solche stellen Aufgaben, die zum Teil von den Erörterungen über Analysen im Vollblute aus zugänglich sind, aber meistens besondere Aufmerksamkeit erfordern. Am ungünstigsten stellt sich die Arbeitsweise nach Bloor. Indican, Lutein, Urobilinogen („Urobilin“) sind die Haupttypen der ernsthaften Störungen. Liegen solche vor, so bedient man sich a priori besser der wirksam isolierenden Methoden. Auch Authenrieth befriedigt dann weniger. Hämatin und Porphyrine verhalten sich etwas anders. Ersteres, in gewissen Kreisen mit anhepatischem Bilirubin und Hypocholesterinämie vergesellschaftet, kann, wofern nicht aufmerksam gearbeitet wird, Bloorzahlen schwer schädigen. Wirkliche Bedenken gelten nur für größere Beträge an Chromogenen usw., Grenzbefunde an Cholesterin oder für geringere Beträge bei der Anforderung genauester Befunde. Steht Cholesterin entschieden über der Norm, so gleichen sich diese Interferenzen ab. Ihre Wirkung ist meist nur als technische Störung aufzufassen — Beeinträchtigung der Farbnuance und ihrer Vergleichbarkeit.

Zu obigen Vergleichsuntersuchungen an colorimetrischen Verfahren müssen Nachträge gemacht werden; es fehlt uns zur Zeit noch an genügendem Material. Am wenigsten einfach scheint uns ein Urteil über die Methodik an Gettler und Baker, welche schnellanalytischen Ansprüchen an sich wohl gerecht werden dürfte, von Weston genügend genau befunden wurde (an einigen wenigen Beispielen), aber in der Hand der Autoren selbst offensichtlich abfallende Werte gab. Myers und Wardell haben eine andere Extraktionstechnik beschrieben, deren Voraussetzungen geschildert wurden. Der Kernpunkt liegt in dem Anspruche, daß die Vorbehandlung einen Teil der Interferenzen auszumerzen vermöge. Auch hierfür ist unser Vergleichsmaterial derzeit noch nicht

vielseitig genug, wennschon wir uns gewissen Vorzügen dieser Art schon jetzt nicht zu verschließen vermögen.

Authenrieth und Funk arbeiten mit dem Keilinstrument. Wir haben uns aus vergleichenden Anlässen auf die Präzisionskolorimetrie mit dem Entwicklungsprinzip bezogen. Parallel im Keil mit Dauerlösung bewirkte Bestimmungen standen jenen an Konstanz und Einheitlichkeit nach.

VI. Charakterisierung und Bewertung der maßgebenden Prinzipien in systematischer und technischer Hinsicht.

Wir haben gesehen, daß ein Kreis von Methoden mehr oder minder streng auf „Reincholesterinlösungen“ für die Colorimetrie hinarbeitet und je nach der Wirksamkeit der Maßnahmen verschiedene Erträge in diesem Sinne erzielt. Demgegenüber geht die Bloorsche Technik auf den Gesamtextrakt aus, dessen Voraussetzungen beschrieben wurden. Im Abschnitt V haben wir dargetan, wie sich aus der Gegenüberstellung Unterschiede herleiten. Die Darlegung konzentriert sich, bevor über das Prinzip befunden werden kann, auf technische Verhältnisse. Bloors System der Analyse des Lipämiekomplexes ist — meist ist die Cholesterinbestimmung herausgegriffen worden — in Amerika mehrfach angewandt worden. In Deutschland hat nur Feigl ergiebig an und nach ihm gearbeitet. Die Cholesterinmethodik steht auffällig im Vordergrund, ist modifiziert worden (Denis), hat zu verschiedenen Studien gedient und wurde in methodenkritische Vergleiche verwickelt (s. o.). Widersprüche und Einwürfe sind reicher gefallen, als Arbeitserträge im Interesse der Methode, von der wir sagten, daß sie einen besonderen Gedanken verfolgt. Die sachliche Beschreibung darf an dieser Stelle meines Erachtens entbehrt werden (Literatur).

Was nun die technischen Verhältnisse der Bloorsche Isolierung angeht, so mögen die einleitend vorgebrachten Klagen vorangestellt werden. Sie laufen darauf hinaus, daß man unverhältnismäßig viel „Versager“ erhalte. Diese „Versager“ sind aber auch bei Authenrieth gesehen worden. Sie verschwinden (Weston) in den Methoden, welche der „Reinisolierung“ am nächsten kommen. Csonka schaltete die fraglichen Stoffe durch den Barytzusatz, Weston durch die Zwischenfällung aus. Weston bezweifelt die Resultate (Tabelle oben) Bloors durch Zusatzversuche sowohl in der Isolierung wie in der Bestimmung, auch beide Stadien wechselseitig mit anderen Formen kombinierend. Weston will unter 80 Bestimmungen keinmal eine tatsächlich reine Grünfärbung unter den Händen gehabt haben, Müller hat mehrfach Bedenken gesehen, Myers ebenfalls gelegentlich Hinderungen gefunden (s. o.). Diesen Urteilen mögen hier zunächst obige Befunde und ihre Beschreibung entgegengestellt werden. Bloor verlangt sehr vorsichtiges

Einengen der Extrakte. Müller hat auch bei diesem nicht durchgängig Erfolge gesehen.

Auch in diesem Punkte sind wir in der Lage, Günstigeres zu sagen.

Zur Technik maßgebend ist schon die erste Stufe. Blut bzw. Plasma muß wirklich langsam und tropfenweise, oft unterbrochen unter stetem eifrigen Schütteln in das wenig unter dem Siedepunkt stehende Gemisch eingebracht werden. Tropfenfolgen sind zu vermeiden; stets ist wieder anzuwärmen. Nach dem völligen Einbringen wird immer wieder geschüttelt und eingesenkt — dafür sind 5 Minuten zuzubilligen. Man kann hier durch einige (6—8) Glasperlen (etwas über Hirsekorngröße), deren Vol. im Gefäß ja zu ermitteln ist, schon gewisse Förderung erreichen. Auf keinen Fall darf die Fällung backen. Richtig gehandhabt, bleibt sie zunächst locker und kleinflockig. Man schüttelt nach dem letzten Einsenken nochmals, läßt abkühlen, füllt auf und muß dann erneut (bereits Temperatur des Sd.-Punkts) gründlich mischen. Von da ab kann man Ansätze, gut verschlossen, wochenlang stehenlassen. Das Reagens wurde beschrieben und charakterisiert. Die entnommene Menge wird in kleiner halbkugelter Schale sehr vorsichtig eingengt, da sonst u. U. Bräunung eintritt, deren Produkte in das Chloroform übergehen können. Bequem ist ein geräumiger Glockenexsiccator mit Etagegestell. Er kann (Nähe der Dampfheizung, Brutschrank) gern 25° C haben. Man setzt in ihn einige Schalen mit Paraffinmischung (vgl. Organ-präparative Handbücher „Paraffinexsiccator“); in ihm dünstet man den letzten Teil der Extrakte in vac. (langsam, Spritzgefahr) ab. Man kann Flügelventilatoren verwenden. Das gaben wir auf (Staubgefahr. Vgl. Versager der L.-B. durch „Unreinlichkeit“ der Gläser!). Die Extrakte enthalten Wasserspuren durch die erste Extraktion. Sie seien gründlich trocken (Exsiccator), ehe mit Chloroform aufgenommen wird. Gebräunte Rückstände (die farblos sein würden bei Abwesenheit von Chromogen!) sind meist aussichtslos. Die Aufnahme mit Chloroform kann zu Fehlern führen, wenn nicht sorgsam gearbeitet wird, da der meist lack- oder fettartige Trockenrückstand u. U. Cholesterin zähe festhält. Mit großer Vorsicht beachte man, daß der Extrakt blank, staubrein und frei von Flittern (aus der Schale) gehalten werde. In diesen Maßnahmen liegen schon viele Anlässe zu kleinen, sich summierenden Fehlern. Sie lassen sich bis auf einzelne „Unfälle“ ausmerzen. Der Charakter der Reagentien ist beschrieben; sie seien wasserfrei und entsäuert (!). Sie nehmen — je nach Ansatz — ca. 1—3% Wasser auf. Dadurch verschlechtert sich die lösende Kraft. Zahlreiche Versuche, die Solventien zu entwässern, wurden gemacht, aber bisher ohne durchschlagenden Erfolg. Die notwendige Koagulation und Sprengung der Protocholesteride usw. läßt sich erreichen. In richtig ausgeführten Versuchen ist der Rückstand praktisch frei von Ch., auch bei variiertem Gehalte, wenn der Ansatz modifiziert wird. Rückstandsprüfungen haben bei richtiger Handhabung stets nur Spuren Ch. ergeben beim Auskochen, Trocknen, Heißextrahieren (fortlaufend). Selten trat ein Verlust bis zu 1% der gesuchten Menge ein. Bei mangelnder Handhabung treten unverhältnismäßig schnell gewichtige Defizits ein. An Hand dieses Vorgehens hat man beste Gelegenheit zur Einübung in die anfangs schwierige Arbeitsweise. Wir haben mehrfach restliche Filtrate in größeren Mengen von Blooransätzen schonend (in vac.) eingengt und die Rückstände fraktioniert (Fett, Lipide) und schrittweise analysiert. Auf 100,0 ccm Serum: Norm bis zu 12,0 mg Zucker (10% des Gehalts); NaCl Gp.; U_F^+ voller Betrag; Aminosäuren (ca. 5% des Gehalts); Spuren Bilirubin. Diabetes: bis zu 50,0 mg Zucker; Acetonkörper fast der ganzen Menge entsprechend. Azotämie: Massen von U_F^+ ; reichlich andere RN-Stoffe; Indican und P_2O_5 -Spuren. Cholämie: Reichlich Bilirubin; Cholate deutlich nachweisbar; Sonstiges: Spuren Ht. Ht.porph.;

reichlich Urobilinkörper; mäßig Indican; manche Arzneistoffe; Phenole; die genannten Stoffe sind eingebettet in die vollen Beträge Fett und Lipoid. Aus dem Gemenge ist Ch. herauszuholen. Möglichste Trocknung ist die beste Lösung.

Im Chloroformextrakt (größere Restmengen) konnten für 100,0 ccm Serum gefunden werden: Bilirubin; Cholate (Spuren); Urobilinkörper; Ur-(Spuren); Zucker (Spuren).

Diese Befunde geben ein Bild von der Verwickeltheit der Extrakte und von den möglichen Anlässen zur Verfärbung beim Trocknen. Wir versuchten, den Wassergehalt der Ansätze zu beseitigen, dadurch, daß nach vollendetem Schütteln vor dem Auffüllen Na_2SO_4 oder MgSO_4 , BaCl_2 , Cu_2SO_4 (geringe Mengen, staubfein) eingetragen wurden. Wirkliche Vorteile haben wir nicht gesehen, da Gefahr für Extraktion entstehen kann. Später haben wir versucht, den quantitativen Rohextrakt nach dem Einengen zu läutern. Das gelingt bis zum gewissen Grade ohne Verseifung, durch BaCl_2 und wenig Alkali (differentielle Verseifung, Bang), Eintrocknen und Aufnehmen mit Chloroform. Dabei kommt man aber wieder auf Weston und Kent hinaus, ohne deren Vorteile zu genießen. Übrigens sahen wir bei dieser Gelegenheit, daß auch die Überlastung des Extrakts mit Fett indirekt auf die L.-B. einen ablenkenden Einfluß haben kann (Lösung). Diese sekundären Maßnahmen bringen aber Unsicherheit in den ursprünglichen Gedankengang, weshalb sie, wenn sich nicht noch wirkliche Vorteile herausstellen sollten (die bei Sonderanlässen, z. B. Bilirubin und Cholaten, ja erwünscht wären) nicht weiter verfolgt werden sollen. Eher kann das Myers'sche Prinzip, bei entsprechender Durchprüfung, modifiziert, dem Grundgedanken Bloor's dienstbar gemacht werden.

Es wurden dann in reinen Cholesterinansätzen L.-B.-Proben angesetzt mit Spuren Glucose, U_T^+ , Glycin, Bilirubin, Aceton. Mengen, wie sie im Gange denkbar sind, brachten die colorimetrischen Ablenkungen, „Bräunung“ kaum hervor. Gewisse größere Beträge Glucose, Glycerin, Aceton u. a. bringen jedoch die kritischen Erscheinungen mit sich. Niedere Aldehyde (daher aldehydliefernde Stoffe beim Zerfall) sowie das System — Resorcin — Acetessigsäure (Fluorescenzbildung durch Umbelliferon) können im Verlauf der L.-B.-Probe sich zur Geltung bringen.

Aus allem ersieht man, welche technischen und tatsächlichen Schwierigkeiten vorliegen. Verwickelte und zum Teil ganz unübersehbare Verhältnisse bringen mit den übrigen Bedenken und der an sich kritischen Entwicklung der Liebermann-Burchardprobe vereint, die ja nebenher noch ihren bekannten Interferenzen gerecht wird, Vorstellungen mit sich, gegen die nur das Gewicht trotz obigem bis zum gewissen Grade gefestigter Befunde und der Ausblick auf fernere Möglichkeiten in der Idee der Arbeitsform zur Geltung kommen. Über beide — deren systematischen Wert ausmachend — ist im Einklang mit einleitenden Erörterungen folgendes zu sagen. Fernere Möglichkeiten — Bloor („Gesamt“-Liebermann-Burchard) und z. B. Csonka („Cholesterin“-Liebermann-Burchard + nächste Derivate, Müller) kombiniert — dürfen in der Differenz beider erblickt werden, wenn die störenden Nebenreaktionen näher aufgeklärt sein sollten. In dem Sinne wird man aus dem originären oder verbesserten Arbeitsgange nach Bloor Nutzen ziehen können, weil er den tatsächlichen pathologischen wie genetischen Begleitern (als Interferenzen in der Liebermann-Burchard-Reaktion) gerecht wird. Der

heutige diagnostische Wert der Befunde nach Bloor (als „Cholesterin“) ist mit näheren eigenen Zahlenreihen gekennzeichnet; manches (Digitoninvergleiche) ist nachzutragen. Die Technik läßt sich, unter anfänglichen Schwierigkeiten, gut beherrschen. Urteile wie das von Weston, erscheinen uns nach mehr als 1000 Analysen unverständlich. Auch unter Einhaltung aller Versuchsmaßregeln ist die Technik noch handlich.

In diesem Sinne verglichen, ist die Authenriethsche Methodik zu prüfen. Dieser Autor hat zwei, etwas abweichende Anweisungen gegeben, von denen wir, wie die große Mehrzahl der Untersucher, durchgehend die „direkte“ Chloroformmethode benutzten. Diese hat in gewissen Kreisen des Anwendungsgebietes bisher ziemlich konstante, nach Weston sogar gute Befunde ergeben. Im übrigen hat sie Untersucher, die sie nicht bloß anwendeten, sondern zu bessern suchten, nicht durchaus befriedigt. Dafür waren Ursache die „Störungen“, deren erst kompliziertere Techniken (s. o.) Herr werden. Wir haben in pathologischen Fällen mit der Natriumsulfatbehandlung (Trocknung und Klärung) nicht immer Erfolg gehabt, vielmehr die Waschung mit Wasser vor der Trocknung, wenn sie vorsichtig gehandhabt wird, als zweckmäßig erkannt. Von 18 Analysen, die, originell durchgeführt, unbenutzbar geblieben wären, haben wir bei paralleler Wasserwaschung 12 so weit zu retten vermocht, daß die Unsicherheit in der Colorimetrie fortfiel. Bei nicht genügender Vorsicht kann es passieren, daß die Hydrolyse zu weit geht und solche Stoffe zerstört (außer Ch. und seinen Estern), die den Mehrbetrag gegenüber der Gravimetrie ausmachen.

Es ist verständlich, daß wir den Umfang, die Intensität und die Bedingungen dieser Vorgänge nicht zu übersehen vermögen. In bestimmten blutpathochemischen Bildern werden aber in der Methodik von Authenrieth Stoffe ungleichmäßig gestört und von der Teilnahme an der Liebermann-Burchardprobe ausgeschlossen, die nach Bloor vollständig erhalten und nach den wirksamer klärenden Methoden (Weston, Csonka) weitgehend, wo nicht ganz, ausgeschaltet werden. Am wenigsten darf man hierbei an die Oxydate denken. Wenn sonach die Bloortechnik vor gewissen Blutbildern nicht zum Ziele gelangt, so tut es die weit mehr entspezifizierende nach Authenrieth (in geringerem Grade) kaum mehr. Prinzipielle Gesichtspunkte, die für Bloor sprechen, fallen aber hier fort. Authenrieths Verfahren nimmt eine — als Erleichterung der Handhabung gerechte und meist auch richtig in diesem Sinne aufgefaßte — Zwischenstellung ein, indem sie sich zwar vom nativen Gesamtextrakt (Bloor, Bruttoertrag der Liebermann-Burchardprobe) entfernt, aber andererseits den Weg zur Reinisolierung (im Sinne von Weston wie Csonka) nicht zu Ende schreitet. Sie verzichtet mithin grundsätzlich auf den Ideengang und die Möglichkeiten der einen Stufe, kann sich aber von den Mängeln, die im Gefolge der Erleichterung gegen die andere liegen, namentlich in verwickelteren Aufgaben nicht frei machen. Daher die relativ (gegen Weston usw.) vielen Versager. Sie ist nun, weil handlich, und weil genau genug beschrieben, sehr reichlich angewandt worden. Daß ihr dabei der Mangel zu leichter Bewertung und Ausdeutung zweifelhafter Proben in höherem Grade zur

Last fällt, kann für den Kenner der Literatur keinem Zweifel unterliegen. Sie ist es, für die das Urteil Fe x's zutrifft („leicht ausführbar, geringer Materialbedarf, relative Werte, Auskünfte in einzelner Richtung“ usw.). Das unterstreichen wir, möchten aber darauf hinweisen, daß unsere pathochemischen Materialien uns nahelegen, nur ganz grobe Ausschläge anzuerkennen. Genau und an geeigneten Objekten ausgeführt, kommt sie der engeren Frage doch nicht so nahe wie die sicheren, reinisolierenden Verfahren, speziell Westons und Csonkas, welche auch in komplizierten blutpathochemischen Beispielen gleichbleibendere, in sich geschlossener, parallelkonstantere, objektivere Werte geben, unter denen Versager ungleich seltener vorkommen.

Obschon an gegebenen Stellen gestreift, sei hier noch einmal betont, daß Analysen von Blut sich bei Bloor wie bei Authenrieth und Funk schlechter stellen als von Plasma; namentlich bei letzteren nehmen die Störungen und zweideutigen Färbungen zu. Bloors Prinzip findet — außer im Blute — in serösen Flüssigkeiten seine Grenze, während die Alkalihydrolysen sinngemäß (vgl. Kumagawa-Suto usw.) auch auf Organanteile sinngemäß übertragen werden können.

Was die Methoden von Gettler und Baker wie von Myers und Wardell angeht, so können wir hier nach bisherigen Erfahrungen nur folgendes sagen. Von ersterer haben wir besondere Vorteile nicht erwartet, bei letzterer in schwierigeren Fällen die volle Wirksamkeit der „abfangenden Wirkung von Gips“ auf die Störungen (bei Bloor) nicht erkennen können. Wir geben zu, daß sie Vergilbungen und Bräunungen der Liebermann-Burchardprobe seltener macht, daß aber die wirklich maßgebende Frage einer klareren Entscheidung unter den Interferenten auch hier nicht beantwortet wird. Um diese prinzipielle Angelegenheit handelt es sich, und in dieser nimmt nach bisherigen Ergebnissen die Myers'sche Technik wiederum eine Mittelstellung ein.

Was die Handhabung betrifft, können wir ihr Promptheit und Sicherheit sowie wenig eigentliche Handarbeit und wenig solcher Operationen, die Anlagen zu Fehlerquellen in sich tragen, nachsagen. Wir stehen nicht an, nach unseren Erfahrungen und im Hinblick auf obige vergleichende Charakteristik dieser Methode eine Stellung zuzuweisen, die in der Anwendung zwar dem Fexschen Urteile, aber doch weitgehend gemildert, unterliegt. Für die Frage nach Cholesterin selbst steht sie *et. par.* Weston wie Csonka nach.

Sie gehört indes mit in die von der Isolierung vorausbestimmten und mikroanalytisch so wertvollen Verfahren, im selben Extrakt verestertes Cholesterin neben freiem zu erfassen bzw. kann im Sinne von Bloor, der hierin einen großen Erfolg erzielte, vermutlich nutzbringend ausgebaut werden. Es ist nicht nur die gefällige Digitoninbehandlung an sich, die wir oft anwandten und die wir auf ihrer Grundlage bestätigten,

sondern wir erblicken in ihr, da sie die Überleitung zur „objektiven“ Bestimmung des Cholesterins enthält, Handhaben zur eindringlicheren Kritik der Analysenresultate nach Bloor. Da es sich aber, wie auch die einleitende Besprechung zeigt, um recht verwickelte Fragen handelt, so stellen wir diese Aufgabe zurück, um sie im Rahmen der Vergleichsuntersuchungen zwischen Digitoninfällung und Colorimetrie abzuhandeln. Wir möchten indes betonen, daß die Relation — freies zu verestertem Cholesterin — bei Bloor, trotz der um rd. 50% gegen die Digitoninanalyse zu hohen Werte für „Gesamt“-Cholesterin nicht zu weit von den Befunden gleicher Fragestellungen nach Thaysen, Fex und Kauders u. a. abweicht, daß also äußerst verwickelte Beziehungen aufzuklären sind. Erst auf dieser Basis gewinnen unseres Erachtens die wichtigen und von manchen Methodologen so sehr geschätzten Versuche, zugesetztes Cholesterin neben präformiertem genau zu ermitteln, einen beweiskräftigeren Untergrund, als sie ihn empirisch nach den bisher erörterten Tatsachen finden können.

Wir brechen daher, nach Beendigung eines wichtigen Teiles der vergleichenden Methodologie colorimetrischer Bestimmungsmethoden von Cholesterin in Anwendung auf Blut und Serum, die Darlegung ab und verweisen in Beziehung zur Disposition und zu den textlichen Anknüpfungen auf die in fernerer Mitteilung direkt anzuschließenden Ergebnisse über die noch ausstehenden selbständigen Prinzipien und ausgleichenden Kriterien.

Vorläufige Schlußfolgerungen.

Als vorläufige Schlußsätze mögen folgende Urteile über die colorimetrischen Prinzipien der Cholesterinbestimmung dienen, die wir nun schon in Rücksicht auf die inzwischen erschienene Arbeit von Fex formulieren können.

In präziser Ausführung leisten die colorimetrischen Methoden durchaus Gutes. Ihre Genauigkeit kann zu großer Höhe gehoben werden, die auch exakter Arbeit in reinen Lösungen nicht im Wege steht.

Technische und reaktive Fehlerquellen sind reichlich gegeben; unterliegt man diesen, was bei nicht ganz sorgfältiger Beherrschung der Aufgaben gegenüber andersartigen Methoden unverhältnismäßig leicht eintreten kann, so sinkt die Genauigkeit bis zu Graden, die eine quantitative Benutzung, auch zwecks relativer Ergebnisse, von vornherein in Frage stellt. Das tritt, wenn Isolierungs- und Reinigungsverfahren vorangehen, und besonders, wenn solche in biologischen Flüssigkeiten betätigt werden, in erschwerem Maße ein. Interferenzen komplizieren weiterhin die Verhältnisse. Auch unter solchen Bedingungen läßt sich dem colorimetrischen Prinzip bei strenger Präzision der Charakter einer leistungsfähigen, quantitativen Methode verleihen und erhalten. In systematischer Hin-

sicht ist bezüglich der Blutanalyse auf Tatsachen Bedacht zu nehmen, die mit dem Prinzip der colorimetrischen Reaktionen an sich nichts zu tun haben, die aber in den Werten zum Ausdruck kommen. Man kann auf „gesamtes“ Cholesterin als solches hinarbeiten wollen, andererseits einen Bruttoertrag (komplexer Werte) der Liebermann-Burchardprobe erzielen. „Gesamtes“ Cholesterin in strengstem Sinne ist meines Erachtens bisher trotz verbesserter Methoden auf der genannten Basis nicht zugänglich, die Weiterarbeit am Bruttoertrag wohl aussichtsreich. Unsere Ergebnisse und die Beurteilung der einschlägigen Methoden gründen sich auf vergleichsweise reichhaltiges und vielseitiges Material. Die Frage der Interferenzen bei der Liebermann-Burchardprobe wird unseres Erachtens in bezug auf die Isolierungsmodi dadurch am wirksamsten, zugleich der praktischen Benutzung zugute kommend, gefördert.

Ohne Anlehnung an spezifische Werte vermittelnde Prinzipien sind die extremen Formen colorimetrischer Bestimmungsverfahren in ihrer Abhängigkeit von den Leistungen und Zielen der Isolierungsmaßnahmen für die Frage des wahren Cholesteringehaltes von Blut und Körperflüssigkeiten in weiten Kreisen pathochemischer Verhältnisse mehr oder minder unstichhaltig.

Vergleichsanalysen lediglich unter den colorimetrischen Verfahren können der Aufklärung nicht die Dienste leisten wie solche, die andere Grundlagen mit einbeziehen.

Die Beurteilung der einzelnen Vorschriften setzt reichhaltige, systematische wie methodisch verwertete Unterlagen voraus. Die einzelnen Vorschriften sind gegenüber den verschiedensten, pathochemischen Bildern nicht gleichwertig; unsere Materialien belegen, daß sowohl in technischer wie in tatsächlicher Hinsicht Aufgaben und Methoden miteinander in Einklang gebracht werden müssen.

Das Bild, das die (bisher fehlenden) ergiebigen Vergleichsuntersuchungen bieten und die Gesamtübersicht über die methodischen, kritischen und beschreibend pathologischen Erträge des Gebietes führen zu der Überzeugung, daß nur enge Ausschnitte vor mäßigen Ansprüchen an praktische Brauchbarkeit der Werte bestehen. Es darf damit gerechnet werden, daß zahlreiche Ergebnisse und Urteile in dem an Einzelsvorschriften relativ reichen und, auseinanderstrebend, viel bearbeiteten Gebiete selbst ohne relativen Wert sind.