

Beiträge zur Kenntnis der Lipide des menschlichen Serums und zur Methodik der Lipoidbestimmung.

Von

Dr. phil. et med. W. Klein und L. Dinkin.

(Aus der Wissenschaftlichen Abteilung des Institutes für Krebsforschung in Heidelberg
(Direktor Exzellenz Czerny) und der med. Poliklinik (Direktor Geh. Rat Fleiner).)

— (Der Redaktion zugegangen am 18. Juli 1914.) —
=====

Einleitung.

Die Lipide des Serums sind in der neueren Zeit Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen, welche einerseits ihre Beziehungen zum Gesamtstoffwechsel und anderseits ihre Bedeutung für die serologischen Reaktionen festzustellen suchten.

Der Begriff der Lipide wird bekanntlich heutzutage nicht einheitlich aufgefaßt. Während eine Anzahl Autoren nur die fettähnlichen Stoffe, nämlich das Cholesterin, die Phosphatide, die Cerebroside u. a., als Lipide bezeichnen, werden von anderen überhaupt alle in Äther, Alkohol und ähnlichen Solventien lösliche Substanzen zu den Lipiden gerechnet, wodurch natürlich die Grenze zu weit gezogen wird. Diese Unklarheit resultiert nicht zum geringsten Teil aus der mangelhaften chemischen Kenntnis der Lipide, die besonders in dem schwierigen Gebiet der Phosphatide auffällt. Auch die Chemie der Cholesterine läßt noch viele Fragen unbeantwortet.

Ebenso ungenügend sind unsere Kenntnisse über die Art und Weise, wie die Lipide in den Organismus gelangen. Soweit man über diese zurzeit in lebhaftem Fluß begriffene Frage urteilen kann, ist sie für die verschiedenen Lipide nicht einheitlich.

Lange Zeit glaubte man die Herkunft des Cholesterins im Organismus mit der Anschauung von Naunyn erklären zu können, welcher das Cholesterin als ein Produkt des Stoffwechsels der Gewebszellen auffaßte. So sollte z. B. das Cholesterin der Galle aus den Epithelzellen der Gallengänge stammen. Aber eine synthetische Fähigkeit des Organismus ist bis heute für das Cholesterin noch nicht bewiesen. Vielmehr ist durch die Untersuchungen von Goodman, Aschoff, Röhmann und Bacmeister eine weitgehende Resorption des verfütterten Cholesterins bei pflanzen- und fleischfressenden Tieren nachgewiesen worden. Dabei war auch je nach dem jeweiligen Cholesteringehalt der Nahrung eine entsprechende Zu- bzw. Abnahme des Cholesteringehaltes der Galle, des Serums und verschiedener Organe zu konstatieren. Es ist also nach alledem möglich, daß das Cholesterin des tierischen Organismus der Nahrung entstammt, wobei wohl eine Umwandlung der pflanzlichen Cholesterine (sogen. Phytosterine) in tierische Cholesterine anzunehmen ist.

Bezüglich der Phosphatide sind dagegen in der neueren Zeit eine Reihe Versuche angestellt worden, die eine Synthese im Organismus beweisen sollten. Reicher, der Triglyceride verfütterte, fand im Blute nicht nur eine Vermehrung der Neutralfette, sondern auch der Phosphatide und der Cholesterinester, woraus er auf eine, allerdings nur indirekt bewiesene, Bildung von Phosphatiden schließen will. Auch die Vermehrung der Phosphatide bei den Tieren mit Phosphorvergiftung will der genannte Autor als einen Beweis der Synthese auffassen. Schließlich würden die Fütterungsversuche von Gregersen und Fingerling an Mäusen bzw. Enten ebenfalls für eine Synthese der Phosphatide aus anorganischen Phosphaten sprechen. Die Herkunft der übrigen Bestandteile, besonders der stickstoffhaltigen, wie des Cholins u. a. im einzelnen nicht isolierten stickstoffhaltigen Konstituenten, bleibt allerdings unklar.

Andererseits wird angegeben, daß das Lecithin ein unumgänglicher Bestandteil der Nahrung sei und daß Versuchstiere bei lipoidfreier Nahrung, auch bei reichlicher Zufuhr von an-

organischen Phosphaten doch zugrunde gehen (Röhl, Stepp, Heubner). Den Tod der Tiere haben Dezani u. a. nach ähnlichen Fütterungsversuchen dem Mangel an Cholesterin zugeschrieben. Diese Widersprüche sind anscheinend zum Teil der schon oben erwähnten Unsicherheit, die auf dem Gebiete der Lipoidchemie herrscht, zuzuschreiben; wir sind hier vorläufig nur auf Vermutungen angewiesen.

Aus dem Magendarmkanal gelangen dann die Lipoiden höchstwahrscheinlich ebenso wie das Fett auf dem Lymphwege in die Blutbahn und bilden einen Bestandteil des Serums. Die Analysen des letzteren, wie sie mit Berücksichtigung des Cholesterins besonders von Grigaut und seinen Schülern ausgeführt wurden, ergaben, daß sein Gehalt an Lipoiden (Cholesterin) schon unter physiologischen Verhältnissen bedeutend schwankt.

Von den verschiedenen Lipoiden wurde in der letzten Zeit besonders das Verhalten des Cholesterins und zwar des Gesamtcholesterins studiert, weil es durch die neueren Untersuchungsmethoden am zugänglichsten geworden ist, und seine Bestimmung auch in der Klinik leicht durzuführen ist. Diese Untersuchungen ergaben eine Erhöhung des Cholesteringehaltes des Serums nach der Nahrungsaufnahme, bei der Gravidität, bei einigen schweren Stoffwechselerkrankungen (Diabetes, Fettsucht), bei Nephritis und Atheromatose. Pathologische Veränderungen der letzteren Art wurden bekanntlich von Aschoff, Wacker und Hueck künstlich durch Cholesterinfütterung an Tieren erzeugt. Eine Verminderung des Cholesterins wurde bei vielen akuten und chronischen Erkrankungen und bei malignen Tumoren, soweit sie mit Kachexie einhergehen, konstatiert (Grigaut, Bürger und Beumer, Klinkert, Henes, Obakewitsch u. a.). Bei Lues wurde von einigen Autoren eine Vermehrung konstatiert, von anderen dagegen normale Werte oder sogar eine Verminderung vorgefunden. In Anbetracht dieser Variationen des Lipoidgehaltes des Serums bei verschiedenen pathologischen Zuständen muß man die Möglichkeit zugeben, daß außer dem Übertritt der fettähnlichen Substanzen in das Serum aus der Nahrung noch

ein Teil — vielleicht der größere — aus Organzellen, Fettdepots und evtl. der Galle hineingelangt. Ist schon der Mechanismus der Resorption und Assimilierung vom Darm aus in allen Einzelheiten noch nicht genügend erforscht, so ist diese Art der Abgabe von fettähnlichen Substanzen aus den Gewebszellen (Blutkörperchen, Nervenzellen etc.) an das Serum bezüglich der Prozesse, die sich dabei abspielen, noch rätselhaft und ebenso problematisch, wie die funktionelle Bedeutung der Lipide. Nach alledem ist die Scheidung der Serumlipide ihrer Herkunft nach zurzeit noch nicht durchführbar.

Der tierische Organismus scheint die Fähigkeit zu haben, die Menge der Lipide im Serum immer annähernd auf einem konstanten Niveau zu erhalten. Wenn man nämlich den Nahrungseinfluß ausschaltet, also das Serum im nüchternen Zustande untersucht, so findet man (nach Wacker und Hueck) den Lipoidgehalt des Serums des betreffenden Individuums immer ungefähr gleich; diese Menge muß man dann als charakteristisch für den gegebenen normalen bzw. pathologischen Zustand ansehen. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit das Blut den Patienten in halbnüchternem Zustande entnommen.

Es ist noch darauf hinzuweisen, daß die meisten klinischen Untersuchungen der Serumlipide, die Konzentrationsverhältnisse, speziell den Gesamteiweißgehalt des Serums, sowie die Verteilung des Phosphor- und Stickstoffgehaltes auf die wasser- bzw. alkohol- und ätherlöslichen Bestandteile, nicht berücksichtigen. Der Wert solcher Gesamtuntersuchungen, wie z. B. der bedeutsamen Arbeiten von Letsche, ist augenscheinlich. Jedoch ist zu bemerken, daß es in dieser Weise nur an tierischem Material, welches leicht in größeren Mengen zu beschaffen ist, durchführbar ist. Wir beschränkten uns deshalb vornehmlich auf die Feststellung des Vorhandenseins der wichtigsten Komponenten der Seren von Gesunden, Carcinomatösen und Luetikern, ohne auf subtile Einzelheiten einzugehen. Natürlich müssen noch Untersuchungen genannter Art durchgeführt werden, um auch von der chemischen Seite aus systematisch in die Serumzusammensetzung des menschlichen Blutes tiefer einzudringen.

Eigene Untersuchungen.

A. Zur Cholesterinbestimmung.

Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins in kleineren Mengen Serum benutzt man am besten die kolorimetrische Methode. Schon Burchard wies darauf hin, daß die hohe Empfindlichkeit der Liebermannschen Cholestolreaktion die Möglichkeit eröffnet, den Cholesteringehalt kleinerer Mengen Substanz auf kolorimetrischem Wege zu bestimmen. Aber beim Serum stellten sich Schwierigkeiten in den Weg insofern, als das Cholesterin, obwohl es sich in Äther sehr leicht löst, bei der einfachen Ausschüttelung sehr unvollkommen in den Äther übergeht. Zur Erklärung wird von einigen Autoren eine chemische Bindung der Lipide an die Eiweißkörper des Serums angenommen (J. Bang, Grigaut); andere dagegen halten eine physikalische Anlagerung für wahrscheinlicher (Kumagawa und Suto, Cohn, Wacker und Hueck).

In der neueren Zeit sind Methoden ausgearbeitet worden, bei denen eine Abspaltung der Lipide von den Eiweißkörpern des Serums stattfindet und die dadurch eine bessere Extraktion des Cholesterins gestatten. Man benutzt am besten die auch von Friboes, Wacker und Hueck empfohlene Methode von Autenrieth und Funk.

Genau 2 ccm Serum werden nach Vorschrift mit 20 ccm 25%iger Kalilauge in siedendem Wasserbade 2 Stunden erhitzt. Dabei tritt neben der Verseifung der fettartigen Substanzen eine weitgehende Aufspaltung der Serumbestandteile unter NH_3 -Entwicklung ein. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit im Scheidetrichter 6mal mit je 50 ccm Äther je 5 Minuten lang gründlich ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge werden abdestilliert, und das Cholesterin, das vielfach als weißer krystallinischer Belag am Boden des Gefäßes bleibt,¹⁾ in genau 100 ccm Chloroform aufgenommen.

¹⁾ Ob die Spaltung der Cholesterinester dabei eine vollständige ist, und ob der Rückstand aus reinem Cholesterin besteht, wurde nicht nachgeprüft.

Man kann auch das mit Kalilauge erhitzte Serum direkt 5 mal mit je 20 ccm Chloroform ausschütteln und die vereinigten Chloroformauszüge mit 5—10 g Natriumsulfat entwässern und reinigen. Es empfiehlt sich, auch die ätherischen Auszüge durch Schütteln mit ein paar Gramm Natriumsulfat zu reinigen. Der Cholesteringehalt der Chloroformlösung wird dann mit Hilfe der Liebermann-Burchardschen Reaktion bestimmt, indem man genau 5 ccm der Chloroformlösung in ein 10 ccm-Meßzylinderchen hineinfüllt und nach dem Hinzufügen von 2 ccm Essigsäureanhydrid und genau 0,1 ccm konzentrierte Schwefelsäure das ganze Gemisch 15 Minuten lang im Dunkeln stehen läßt. Es tritt dabei eine Grünfärbung des Gemisches auf, die aber meistens, wie wir beobachteten, einen Stich ins Gelbliche hat, was die Ablesung im Kolorimeter erschwert. Es ist möglich, daß hierdurch niedrigere Werte bei der Ablesung resultieren, da, wie auch Stanford angibt, es schwierig ist, bei differentem Farbenton auf gleiche Lichtstärke einzustellen. Mitunter ergab ein kürzeres Stehenlassen des Reaktionsgemisches (8—10 Minuten) höhere Werte, weil dann das Gemisch noch keinen gelben Farbenton zeigt. Die Farbe der Liebermann-Burchardschen Reaktion, die mit dem Cholesterin aus den im Soxhlet-Apparat extrahierten Seren (s. u.), ausgeführt wurde, war dagegen schön grün und hatte, mit dem Keil des Autenrieth-Königsbergerschen Kolorimeters verglichen, eher einen Stich ins Bläuliche als ins Gelbliche; dieser gelbe Farbenton ist also auf die Behandlung mit konzentrierter Kalilauge zurückzuführen.

Die ähnliche Methode von Grigaut ergibt geringere Werte als die Autenriethsche. Die von Iscovesco leistet dasselbe, ist aber viel komplizierter und erfordert größere Mengen Serum. Auch die Methode von Weston und Kent und die kolorimetrische Bestimmung des Cholesterins mit Hilfe der Tschugaieffschen Reaktion sind komplizierter und eventuell weniger zuverlässig als die Autenriethsche Methode.

Freilich ist die Bestimmung des Cholesterins mit der Liebermann-Burchardschen Reaktion, wie es bei allen ko-

lorimetrischen Methoden der Fall ist, nicht ganz einwandsfrei, da erstens noch andere Stoffe in Betracht kommen, welche die Reaktion geben (unbekannte hochmolekulare Alkohole) und anderseits Stoffe aufgefunden sind, welche die Liebermann-Burchardsche Reaktion nicht geben, dagegen die Salkowskische und die von Neuberg-Rauchwerger. Zu den ersteren hat man zu rechnen außer den pflanzlichen Cholesterinen und den tierischen Cholesterinderivaten z. B. die Cholsäuren, die ja mit dem Cholesterin verwandt sind. Nach Wieland und Weil geben die Derivate dieser Säuren die Liebermann-Burchardsche Reaktion. Jedoch scheint eine merkbare Beeinflussung der Bestimmung des Serumcholesterins durch die oben genannten Stoffe nicht in Betracht zu kommen. Eine andere Frage ist, ob Spaltprodukte des Cholesterins im Serum vorkommen, die keine Farbenreaktion geben. Die von Lifschütz beschriebenen Oxydationsprodukte des Cholesterins werden angeblich bei der Gesamtcholesterinbestimmung mitbestimmt. Überhaupt ist die letztere Frage noch in vieler Hinsicht ungeklärt.

Die Seren wurden für die Cholesterinbestimmung im halbnüchternen Zustande — d. h. meistens nach dem Morgenkaffee — entnommen. Das Serum eines Menschen (Selbstversuch) enthielt z. B. im nüchternen Zustande 150 mg Cholesterin; nach der Mahlzeit waren es 185 mg (auf 100 ccm Serum berechnet). Geringe Hämolyse scheint den Cholesterin-gehalt des Serums nicht zu beeinflussen.

Die nachstehenden Bestimmungen nach Autenrieth, mit der Äthermethode ausgeführt, ergaben folgende Werte:

Nr.	Name	Alter	Diagnose	Cholesterin in 100 ccm mg
1	D.	—	normal	140
2	Di.	22	„	150
3	K.	18	„	160
4	Bl.	23	„	220
5	Dr. K.	35	„	230
6	Hot.	—	„	160

Fortsetzung.

Nr.	Name	Alter	Diagnose	Cholesterin in 100 ccm mg
7	S.	66	Ca. orbitae, ulceriert	240
8	Seid.	28	» recti	200
9	B.	—	» oesophagi coeh	138
10	G.	55	» recti	170
11	Go.	—	» »	200
12	B.	63	» sigmoidei	134
13	W.	25	» mammae	210
14	F.	30	» recti	150
15	G.	60	» oesophagi	146
16	E.	—	» portion.	140
17	K.	—	» hepatis	140
18	B.	—	Lues	320
19	G.	—	»	262
20	Sch.	—	Tabes dors.	234
21	D.	—	Paralyse	280
22	F.	—	»	200
23	E.	—	»	126
24	N. N.	—	»	156
25	»	—	Lues	228
26	»	—	»	146
27	»	—	»	160
28	P.	—	»	286
29	M.	—	Paralyse	280
30	Ascitesflüssigkeit, Ca. peritonei			100
31	Pleuraexsudat, Ca. pleurae			132
32	Hund I			240
33	» II			250
34	» III			190
35	» IV, Gravid			340

Die Werte beim Normalen schwanken in dieser Tabelle zwischen 140—230 mg. Autenrieth, Grigaut, Obakewitsch, Henes geben an: 140—185 mg. Bei den Carcinomatösen kann man aus dieser Tabelle auf keine besonderen Abweichungen schließen. Die Durchschnittszahl beim Gesunden beträgt 177 mg

bei Carcinom 174 mg. Von den 12luetischen Patienten hatten 8 eine ausgesprochene Vermehrung des Gesamtcholesterins. Das würde stimmen mit den Untersuchungen von Grigaut, Obake-witsch, Röhmnn u. a., die eine Vermehrung des Gesamtcholesterins bei den meisten Lueskranken fanden.

Alle diese Bestimmungen wurden, wie gesagt, nach der Äthermethode ausgeführt. Friboes gibt an, daß beim Arbeiten nach der Chloroformmethode nach dem Verdampfen des Chloroforms im Destillierkolben neben dem Cholesterin eine Substanz zurückbleibt, die große Ähnlichkeit mit den sauren Saponinen hat und bisher noch unbekannt sei. Friboes schlägt den Namen «Saponoid» vor. Um diese Substanz darzustellen, wurde nach der Friboesschen Angabe in folgender Weise verfahren:

5 ccm Serum (Mensch) wurden 2 Stunden lang in siedendem Wasserbade mit 35 ccm 25%iger Kalilauge erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Flüssigkeit 5mal mit je 40 ccm Chloroform ausgeschüttelt und die gesammelten Chloroformauszüge nach längerem Schütteln mit Natriumsulfat und nach wiederholtem Filtrieren abdestilliert. Am Boden des Gefäßes blieb eine gelblich-bräunliche Masse zurück. Dieser Rückstand wurde wiederholt mit Äther verrieben, bis der abfiltrierte Äther keine Cholesterinreaktion mehr zeigte. Die Substanz, die sich in dem Äther nicht löste und das von Friboes beschriebene Saponoid darstellen soll, wurde in ebensoviel Kubikzentimeter physiologischer Kochsalzlösung gelöst, als Serum verarbeitet und noch einigemal aus Menschen- und Hundeserum dargestellt.

Die Eigenschaften der Lösung der Substanz in physiologischer Kochsalzlösung stimmten mit denen der Friboesschen nicht in allen Punkten überein. Die Lösungen waren opaleszierend, schäumten stark beim Schütteln und zeigten in ganz konzentrierten Lösungen Neigung zum Gallertisieren; durch konzentrierte Salzlösungen wurde die Substanz gefällt. 1 ccm der Lösung löste 1 ccm 5%iger Hammelblutkörperchenaufschwemmung fast momentan; 0,2 lösten erst nach 45 Minuten.¹⁾

¹⁾ Die serologische Prüfung wurde in dankenswerter Weise von Herrn cand. med. Walz ausgeführt.

Nur war entgegen der Angabe von Friboes die Reaktion gegen Lackmus ebenso wie gegen Phenolphthalein alkalisch. Beim Veraschen lieferte die Substanz ebenfalls alkalische Asche. Es war auch keine Reduktion mit Goldchlorid zu erhalten.

Was aber die chemische Konstitution der Substanz anbetrifft, so muß man annehmen, daß es sich im wesentlichen um Seife handelt, die sich beim Kochen mit konzentrierter Kalilauge aus den fetthaltigen Bestandteilen des Serums bildet. Die Tatsache, daß die Substanz durch Zusatz von Säure ausgefällt wird, ist so zu deuten, daß durch den Zusatz von Säure die in Wasser unlöslichen Fettsäuren in Freiheit gesetzt werden. Diese lösen sich auch meist glatt in Äther, worüber bei Friboes eine Angabe fehlt. Diese Fettsäuren lassen sich nach Zusatz von etwas Alkohol und Phenolphthaleinlösung titrieren. Das Fehlen von Asche bei Friboes ist also so zu deuten, daß nach dem Reinigen der Substanz durch das Ausfällen mit Mineralsäuren nur die in Freiheit gesetzten Fettsäuren verascht werden, die dabei natürlich keine Asche liefern. Bei der Aufnahme der Fettsäuren mit Wasser und einer Spur Natriumcarbonat bildet sich dann wieder Seife. Schließlich sprechen alle übrigen Tatsachen, die auf eine Verwandtschaft der Substanz mit den Saponinen hinweisen, auch für den Seifencharakter der Substanz. Was die Reduktion betrifft, die bei uns immer fehlte, so kann sie von mitgeschleiftem Serum herrühren. Das mit Kalilauge erhitzte und ausgeschüttelte Serum reduziert nämlich Goldchlorid sehr stark, und ungenügende Reinigung des Chloroformauszuges mit Natriumsulfat könnte vielleicht ein Reduktionsvermögen der in Frage kommenden Substanz vortäuschen. Eine verdünnte Lösung von Sapo medicatus gibt nach Erwärmen mit KOH übrigens dieselbe violette Färbung mit Goldchlorid, wie das alkalisierte Serum.

Über das Vorhandensein von freiem Cholesterin im Serum neben dem an Fettsäure gebundenen liegen ältere Angaben von Hepner und Letsche vor. Der erstere gibt an, bei seinen Untersuchungen freies Cholesterin im Serum gefunden zu haben. Letsche fand in seinen Extrakten aus Pferdeserum bis zu 5% des Gesamtcholesterins frei vor, welches letzteres er durch frak-

tioniertes Auskrystallisieren aus dem Alkohol von den Estern trennen konnte.

Durch die Methode von Windaus, nach welcher das freie Cholesterin aus 1%iger alkoholischer Lösung durch Zusatz von Digitonin ausgefällt wird, wurde die Möglichkeit eröffnet, den Gehalt des Serums an freiem Cholesterin leichter und sicherer als früher zu bestimmen. Nach Hepburn z. B. bekommt man eine Ausbeute bis zu 97,37%. Allerdings hat die Methode ihre Schwierigkeiten und bei fehlender Übung kann sie ungenaue Werte ergeben. Auch muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß im Serum esterartige Cholesterinverbindungen vorhanden sind, welche ebenfalls durch das Digitonin gefällt werden. Wir richteten uns hauptsächlich nach der Angabe von Autenrieth, nach der zu einem Extrakt aus 50 ccm Serum ungefähr 50—60 ccm 1%iger Digitoninlösung zugefügt werden müßten. Das Digitonincholesterin fiel meistens als weiße krystallinische Masse aus; in einigen Fällen war der Niederschlag amorph und flockig. Nach Windaus besitzt das Digitonincholesterid keinen Schmelzpunkt, sondern zersetzt sich über 240°. Nach unserer Bestimmung erweicht das Cholesterid bei 225° und schmilzt unter Zersetzung gegen 260°. Da dieselben Daten auch für das reine Digitonin Merk gelten, so ist eine Identifizierung des Niederschlags durch die Schmelzpunktbestimmung nicht angängig. Ob die Bestimmung in einem durch Aceton von den Phosphatiden befreiten Extrakt quantitativer ist als in einem unbehandelten Extrakt, sei dahingestellt. Bei Thaysen findet man übrigens die Angabe, daß die Anwesenheit von Phosphatid die Bestimmung nicht stört.

Die Methode von Windaus wurde in der letzten Zeit vielfach zur Bestimmung des Serumcholesterins angewandt. Die Ergebnisse einzelner Autoren widersprechen sich dabei in mancher Beziehung. So fand z. B. Schulz eine Vermehrung des freien Cholesterins in einigen Wassermann-positiven Seren; Röhm und Pighini suchen sogar die Spezifität der Wassermann-Reaktion auf erhöhten Cholesteringehalt der Luessera zurückzuführen, was nicht ohne Grund von Bürger und Beumer bestritten wird. Auch fanden die letzteren ebenso wie Kauders

keine besonderen Differenzen zwischen dem Cholesteringehalt Wassermann-positiver und -negativer Seren.

Diese Widersprüche lassen sich vielleicht teilweise durch die eben erwähnten Schwierigkeiten der Windausschen Methode erklären. Aber auch die Art, wie das Serum zur Lipoid- bzw. Cholesterinbestimmung behandelt wird, verdient die größte Beachtung; denn es ist nicht zu bezweifeln, daß die verschiedenen Methoden, die die einzelnen Autoren anwandten, durchaus ungleichwertig sind.

B. Lipoidbestimmung.

Die früher viel gebrauchte Extraktionsmethode, die das Lehrbuch von Hoppe-Seyler angibt, nämlich die Fällung des Serumeiweißes mit Alkohol und die nachherige Extraktion mit Äther ergibt nach S. Fränkel eine zu geringe Ausbeute.

10 ccm eines Serums, dessen Cholesteringehalt, nach der Methode von Autenrieth-Funk bestimmt, 23,3 mg betrug, wurden mit 40 ccm Alkohol übergossen und 48 Stunden stehen gelassen. Dann wurde der Niederschlag abfiltriert und 48 Stunden lang mit Äther extrahiert. Der Cholesteringehalt des Alkohol-Ätherextraktes betrug nur 12,7 mg.

Die Eintrocknung des Serums im Vakuumexsikkator und die nachherige Extraktion im Soxhlet ergibt ebenfalls geringere Werte, als es der Wirklichkeit entspricht.

	Cholesterin aus dem Trockenserum pro 100 ccm	Cholesterin nach Autenrieth pro 100 ccm
B. (Lues)	240 mg	292 mg
Hund I	115 »	240 »
Hund II	190 »	250 »

Am besten bewährte sich die Methode des Trocknens des Serums mit Natriumsulfat oder Natriumphosphat, die Sigmund Fränkel und Aladar Elfer angaben. Das Serum wird mit ungefähr 70% (d. Gewichte nach) Natriumsulfat verrieben; nach einiger Zeit verwandelt sich der Brei zu einer harten Masse, die sich gut pulvern läßt. Es empfiehlt sich indessen, ein Plus

von Na_2SO_4 zu vermeiden und die noch feuchte Masse einige Tage stehen zu lassen. Man wird dann ein allmählich von selbst in ein trockenes Pulver zerfallendes Extraktionsgut erhalten. Bei der Extraktion des auf diese Weise vorbereiteten Serums war immer mindestens ebensoviel Cholesterin zu erhalten, als in dem noch flüssigen Serum nach Autenrieth bestimmt wurde, manchmal sogar um 5—10% mehr. Die Extraktion erfolgte in gewöhnlichen Soxhlet-Apparaten, die überall Glasverschluß hatten. Größere Serummengen (bis zu 200 ccm) wurden in einem speziell bei Desaga bestellten Soxhlet-Apparat extrahiert, der ebenfalls überall Glasverschluß hatte und der bis zu 400 g Substanz fassen konnte. Die von einigen Autoren (Kumagawa und Suto, Thar) angegebenen Heißextraktionsapparate sind bei den nach Fränkel und Elfer getrockneten Seren entbehrlich, da die Temperatur bei der Extraktion mit dem Lösungsmittel, das angewandt wurde, einem Gemisch aus 2 Teilen Alkohol und 1 Teil Äther, genügend hoch steigt (40 bis 50°). Dabei verwandelt sich die zu extrahierende Masse, wenn kein großer Überschuß an ungesättigtem Natriumsulfat da ist, in einen weichen Brei ($\text{Na}_2\text{SO}_4 + 10 \text{ aq.}$ schmilzt bei 33°, Na_2HPO_4 schmilzt bei 38°), der sich sehr gut extrahieren läßt.

Der Petroläther, der oft als Extraktionsmittel gebraucht wird, ist anscheinend am wenigsten dazu geeignet. Kumagawa und Suto stellten anlässlich ihrer Arbeit über die Fettbestimmung eine Reihe Versuche an, um die Extraktionsfähigkeit verschiedener Lösungsmittel zu prüfen. Dabei ergab sich folgende Reihe (die Menge der mit Alkohol extrahierten Substanzen ist gleich 100 angenommen):

Alkohol	100	Aceton	62
Methylalkohol .	99	Benzol	53
Essigäther . . .	77	Äther abs. . .	46
Chloroform . . .	72	Petroläther . .	45

Bei der Extraktion eines im Exsikkator getrockneten Serums erhielten wir folgende Werte (es wurden je 1 g extrahiert):

	Dauer der Extraktion	Gewicht des Rückstandes	Cholesterin darin
Alkohol	18 Stunden	0,076	0,0150
Chloroform . .	18 >	0,061	0,0092
Aceton	18 >	0,023	0,0037
Petroläther . .	18 >	0,01	0,002

Hundeserum (100 ccm) mit Natriumsulfat getrocknet. Es wurden je 25 g der getrockneten Masse extrahiert:

Lösungsmittel	Dauer	Cholesterin auf 100 ccm berechnet
Alkohol	18 Stunden	0,162
Alkoholäther	18 >	0,160
Äther	18 >	0,064
Petroläther	18 >	0,061

Wenn man aber die Extraktion längere Zeit fortsetzt, so gleichen sich die Unterschiede bedeutend aus, ohne vollkommen zu verschwinden.

48 ccm Serum (Cholest. n. Autenrieth-Funk gleich 290 mg in 100 Serum) ergab, im Vakuumexsikkator getrocknet, 5,05 g Trockenrückstand. Zur Extraktion wurde je 1 g verwandt.

Extraktionsmittel	Dauer	Cholesterin
Alkohol	48 Stunden	0,0267
Alkoholäther	48 >	0,0265
Äther	48 >	0,0240
Petroläther	48 >	0,0234

Von einer mit Natriumsulfat getrockneten Ascitesflüssigkeit (500 ccm) wurden je 100 g extrahiert.

Extraktionsmittel	Dauer	Gewicht des Extraktes	Darin Cholesterin
Alkoholäther . .	48 Stunden	0,327	0,066
Alkohol	48 >	0,320	0,065
Chloroform . . .	48 >	0,292	0,052
Äther	48 >	0,284	0,044
Petroläther . . .	48 >	0,279	0,042

22*

Ein Teil der oben erwähnten im Vakuumexsikkator getrockneten Sera, die nicht im Soxhlet-Apparat, sondern bei gewöhnlicher Temperatur im Schüttelapparat mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert wurden, zeigten oft noch die Fähigkeit, sich unter Aufquellung in einer Menge Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung, die der ursprünglichen Serumkonzentration entsprach, zu lösen. Die mit diesen Lösungen angestellten Komplementbindungsversuche ergaben, daß sie die Komplementhämolyse außerordentlich stark hemmten. Um die Hemmung aufzuheben, war etwa die 20fache Komplementdosis erforderlich. Diese Eigenschaften waren bei den mit Alkohol extrahierten Seren am stärksten ausgesprochen; die mit Äther geschüttelten Seren hemmten schwächer, und am geringsten war die Hemmung bei den mit Aceton und Petroläther extrahierten. Gleichzeitig konnte man beobachten, daß der Alkohol die Lipide am besten extrahierte, während Äther, Aceton und Petroläther in der angeführten Reihenfolge immer weniger zu extrahieren imstande waren.

Menge des getrockneten Serums	Extraktionsmittel	Dauer der Extraktion	Gewicht der extrahierten Lipide	Stärke der Hemmung der Komplementhämolyse durch 0,1 ccm extrahiertes Serum
1 g	Alkohol	36 Std.	0,072	starke Hemmung
1 »	Äther	36 »	0,046	» »
1 »	Aceton	36 »	0,013	{ 0,1 ccm Komplement: Hemmung 0,2 » Komplement: Lösung
1 »	Petroläther	36 »	0,010	
				0,1 » Komplement: Lösung

Der Zusatz der extrahierten lipoiden Stoffe hatte keine merkbare Beeinflussung des Phänomens zur Folge. Es mußten also durch die Behandlung mit den Extraktionsmitteln tiefergreifende Veränderungen, vielleicht an den labilen Eiweißteilen stattgefunden haben.

Zur Extraktion wurde also ein Gemisch aus 2 Teilen Alkohol abs. und 1 Teil Äther gebraucht, da der Alkohol am besten zu extrahieren scheint und der Zusatz von Äther die Extraktionskraft nicht herabsetzte, dafür aber die Tem-

peratur im Soxhlet-Apparat nicht so hoch steigen ließ, was angesichts der leichten Zersetzlichkeit der Phosphatide erwünscht ist. Vielleicht werden durch den Zusatz von Äther auch die Cholesterinester und ein Teil des Phosphatids besser extrahiert.

Die Extraktion wurde mindestens 48—72 Stunden lang fortgesetzt. Nach dieser Zeit ist das mit Natriumsulfat getrocknete Serum praktisch als völlig erschöpft zu betrachten. (200 ccm Hundeserum wurden mit Natriumsulfat getrocknet und 48 Stunden lang mit Alkoholäther extrahiert. Das Gewicht des ätherlöslichen Rückstandes betrug 1,179. Dann wurde noch 48 Stunden lang mit Petroläther extrahiert; Gew. d. ätherlösl. Rückstandes 0,011. Es waren somit nur noch 0,92% der Gesamtmenge von Lipoid in den Petroläther übergegangen.)

Nach vollendeter Extraktion wurde der Inhalt des Soxhlet-Kolbens in Porzellanschalen auf dem Wasserbade eingedampft und der Rückstand mit Äther aufgenommen. Dabei blieb ein beträchtlicher Teil in der Schale zurück. Die Trennung dieser ätherunlöslichen Portion von der ätherlöslichen wurde, da die Filtration schwierig und zeitraubend war, mittels der Zentrifuge durchgeführt. Die erhaltene Ätherlösung wurde im Wasserbad eingedampft. Dabei schied sich immer noch ätherunlösliche Substanz ab, meist von weißer Farbe; eine gelegentliche Untersuchung ergab bei diesen geringen Substanzmengen alkalische Asche, zuweilen auch die Liebermann-Burchardsche Reaktion. Auf Phosphor wurde nicht geprüft. Ein nochmaliges Auflösen und Zentrifugieren hatte den Effekt, daß die zur folgenden Acetonfällung stark eingeeengte Ätherlösung klar blieb.

I. Die ätherlösliche Portion.

Die auf die oben genannte Weise gereinigte ätherlösliche Portion des Extraktes wurde dann, zur Trennung der Phosphatide von den anderen Lipoiden, mit kaltem Aceton gefällt. Die Fällung mit heißem Essigäther, wie sie bei der Trennung der Gehirnlipoide angewandt wird, wurde nicht ausgeübt, da

Säurefreiheit wegen der nachfolgenden Aciditätsbestimmung erwünscht war. Der Niederschlag, der bei der Acetonfällung entstand, war von wachsartiger Konsistenz und gelblich-brauner Farbe. Der Niederschlag wurde abfiltriert und nach der vollständigen Entfernung des Acetons im Vakuumexsikkator in Äther wieder aufgelöst und die Fällung noch ein- bis zweimal wiederholt. Dabei fiel der Niederschlag hellgelb meist flockig aus.

a) Der acetonunlösliche Teil der ätherlöslichen Portion.

Der so gewonnene acetonunlösliche Teil, der hauptsächlich das lecithinartige Phosphatid des Serums enthält, wurde nach vollständiger Entfernung des Acetons, das vielleicht in eine lockere chemische Bindung mit dem Phosphatid eingeht, in heißen Alkohol abs. aufgenommen. Es blieb immer ein geringer Rückstand, der selbst beim Kochen sich in dem Alkohol nicht löste. Er wurde mit Hilfe der Zentrifuge von der Lecithinlösung getrennt. In Wasser löste sich der Rückstand leicht und meist klar. Die Reaktion war neutral; ammoniakalische Silberlösung wurde nach 2—3 Minuten langem Kochen weinrot gefärbt. Diese Färbung nahm in der Kälte einen dunkleren Ton an und blieb ohne nennenswerte Silberausscheidung lange Zeit beständig. Fehlingsche Lösung wurde ebenfalls ganz schwach reduziert. Zur quantitativen Elementaranalyse waren die Mengen, die immer erhalten wurden, leider zu gering. Phosphor konnte in Spuren nachgewiesen werden. Nach dem Kochen mit 2—3 Tropfen verdünnter Salzsäure wurde die Reaktion mit Fehling nicht verstärkt. Es ist zu vermuten, daß es sich um dieselbe jecorinartige Substanz handelt, die von Baldi und Letsche in größeren Mengen aus Pferdeserum isoliert wurde.

In der größeren alkohollöslichen Portion des acetonunlöslichen Teiles (dem eigentlichen Lecithin) wurde dann die Hydrolyse mit Barythydrat nach Hoppe-Seyler ausgeführt. Nach zweistündigem Kochen der salbenartigen Substanz mit Barytwasser, was zweckmäßig wegen Neigung zu starkem Übersäumen in einem geräumigen Becherglas mit überstülptem

Glastrichter geschieht, wurde der überschüssige Baryt durch Einleitung von CO_2 ausgefällt und der Inhalt des Becherglases filtriert. Bekanntlich gehen bei der Hydrolyse die Glycerinphosphorsäure und das Cholin in Lösung, während die Fettsäuren sich an Baryt gebunden ausscheiden. Das Filtrat, welches Cholin und Glycerinphosphorsäure enthielt, wurde eingedampft unter Zusatz einer geringen Menge Salzsäure das Cholin in Alkohol abs. aufgelöst und aus dieser Lösung mit Platinchlorid ausgefällt. Der Phosphor der Glycerinphosphorsäure wurde nach Neumann bestimmt. Der Filtrerrückstand, der außer an Baryt gebundenen Fettsäuren noch BaCO_3 enthält, wird mit n_{11} -Salzsäure zersetzt und im Scheidetrichter mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Die durch den Zusatz von Salzsäure freigewordenen Fettsäuren gehen in den Äther über. Nach Zusatz von etwas Alkohol und ein paar Tropfen Phenolphthalein wird bis zu 5 Minuten lang bleibender Rotfärbung titriert. Außer der Barythydrolyse wurde in einem kleinen Teil des acetonunlöslichen Teiles der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt; leider stand uns damals kein Mikro-Kjeldahl-Apparat zur Verfügung, sodaß die Stickstoffzahlen unter Vorbehalt mitgeteilt werden.

Die Menge des Phosphors war immer etwa um die Hälfte geringer, als sie sein sollte, wenn der gesamte acetonunlösliche Teil aus reinem Distearyllecithin bestünde. Außerdem war das Verhältnis des P zum N nicht 1 : 1, sondern drei- bis fünfmal höher. Man könnte hier an Di- und Triaminophosphatide denken; aber auch da ist anzunehmen, daß noch N-haltige Verbindungen dabei waren. Mac-Lean gibt zwar eine Methode an, das Lecithin durch Aufschwemmung in Wasser und nachheriges Hinzufügen von Aceton zu reinigen. Dabei bleiben die N-haltigen Verunreinigungen in Wasser gelöst, während das Lecithin als weiße Masse auf die Oberfläche steigt. Aber diese Art der Reinigung ist mit Verlusten verbunden, und bei den kleinen Mengen, die zur Verfügung standen, wurde darauf verzichtet.

In der letzten Zeit haben viele Untersuchungen bewiesen, daß die Frage über die chemischen Verhältnisse der lecithin-

artigen Körper bedeutend komplizierter ist, als man früher annahm. Jedenfalls ist soviel bekannt, daß das Lecithin keine einheitliche Substanz ist und daß sogar das als Prototyp geltende Lecithin ab ovo neben dem Cholin noch andere stickstoffhaltige Verbindungen enthält, die mit Platinchlorid nicht fällbar sind (Trier). Auch wurden in ihm konstant Calcium und Eisen nachgewiesen. Außerdem ist durch die von Paal und Oehme ausgearbeitete Hydrogenisationsmethode der Fettsäuren mit H und kolloid. Palladium der Nachweis erbracht worden, daß die Phosphatide einen Gehalt auch an niederen Fettsäuren aufweisen und nach den Versuchen von Malengreau und Prigent ist schließlich die Möglichkeit einer esterartigen Bindung zwischen Cholin und Phosphorsäure zu bezweifeln. Auch sei hier beiläufig bemerkt, daß die angebliche Synthese des Lecithins von Grün und Kade keine nähere Aufklärung über die Konstitution des Lecithins gebracht hat. Wir müssen nach alledem annehmen, daß die übliche Berechnung des Phosphatids aus dem Phosphorgehalt als Distearylecithin ungenau ist.

b) Der acetonlösliche Teil der ätherlöslichen Portion.

Der acetonlösliche Teil enthält hauptsächlich das gebundene und freie Cholesterin, Fett, freie Fettsäuren und kleine Mengen Phosphatid. In einigen auf letzteres untersuchten Fällen entsprach die Menge des Phosphors im acetonlöslichen Teile dem fünften bis zehnten Teil des acetonunlöslichen Teiles. Auch Stickstoff wurde in kleinen Mengen vorgefunden sowie Permanganat reduzierende Substanz.

Nach dem Verdampfen des Acetons und der Trocknung im Exsikkator wurde der Rückstand gewogen und dann in einer bestimmten Menge heißen Alkohols gelöst. Nach dem Erkalten schied sich in den meisten Fällen eine weiße krystallinische Substanz in geringen Mengen aus. Sie wurde immer abfiltriert und gewogen oder kolorimetrisch bestimmt. Bei der Untersuchung stellte sich heraus, daß es sich um Cholesteryl-

palmitat handelte (Schmelzpunkt: 78—79°, Liebermann-Burchardsche und Salkowskische Reaktion).

In der alkoholischen Lösung wurde das freie Cholesterin mit Digitoninlösung nach oben genannter Vorschrift ausgefällt. Ein anderer Teil wurde durch 12stündiges Kochen mit 5 ccm n_{D20}^{20} -alkoholischer Kalilauge verseift, der Alkohol auf dem Wasserbad abgedampft und der Rückstand mit verdünnter Schwefelsäure aufgenommen. Die freigewordenen Fettsäuren ließen sich leicht durch Ausschütteln im Scheidetrichter in Äther lösen und wurden nach Zusatz von etwas Alkohol und Phenolphthaleinlösung mit wässriger n_{D20}^{20} -Natronlauge titriert. Im Reste des acetonlöslichen Teiles wurde zunächst die Acidität und schließlich noch das Gesamtcholesterin kolorimetrisch bestimmt.

II. Die ätherunlösliche Portion.

In der ätherunlöslichen stark hygroskopischen Portion sind vorwiegend Salze zu erwarten, die durch den Alkohol, der im Extraktionszylinder wohl geringe Mengen Serumwasser aufnimmt, extrahiert werden. Bei der Behandlung des getrockneten Extraktes bleiben diese Salze (vorwiegend Na_2SO_4 und NaCl), die bis zu $\frac{1}{3}$ der ätherunlöslichen Portionen ausmachen, ungelöst zurück. Neben ihnen konnte man nach dem Digerieren mit Alkohol abs. in den letzteren noch verschiedene organische Substanzen nachweisen. Als solche kommt vor allem Seife in Betracht; ab und zu wurden auch kleine Mengen Cholesterinester nachgewiesen. Cholin und organischer Phosphor waren bei der Barytverseifung, analog derjenigen im acetonunlöslichen Teil, immer in bestimmbar Mengen nachzuweisen. Es ist also anzunehmen, daß ein Teil des Phosphatids trotz der wiederholten Extraktion der ätherunlöslichen Portion mit wasserfreiem Äther doch zurückbleibt. Worauf diese schwere Löslichkeit im Äther beruht — ob sie von Haus aus dieser Portion des Phosphatids eigen ist oder ob andere Momente daran schuld sind, z. B. die Anwesenheit von Seife neben dem Phosphatid —, das läßt sich schwer sagen. Bei einer Gesamteinschätzung des Lipoidphosphors des Serums

muß natürlich dieser konstant sich vorfindende Phosphatidanteil mit in Betracht gezogen werden.

Die Fettsäurezahlen, die sich bei der Barytverseifung ergaben, sind auf Phosphatid und Seife zu verteilen. Auf das Vorhandensein der letzteren muß übrigens die hämolytische Fähigkeit der organischen Bestandteile der ätherunlöslichen Portion bezogen werden ($2\frac{1}{2}$ mg lösten 2 ccm Blutkörperchenaufschwemmung in $\frac{1}{2}$ Std.). Schließlich ergaben die Aschetitrationen dieser organischen Substanzen, die nach Moritz ausgeführt wurden, eine ziemlich starke Alkaleszenz, die nur zum Teil von der Seife, hauptsächlich aber von dem mitgeschleiften Serumalkali herzurühren scheint.

Die Auflösung der ätherunlöslichen Portion im Wasser war meist etwas trübe, schäumte stark und reagierte meist alkalisch gegen Lackmus und Phenolphthalein. Auch gab sie positive Ninhydrinreaktion, was auf Vorhandensein von Abbauprodukten des Eiweißes schließen läßt. Die Biuretreaktion und Fällung mit Sulfosalicylsäure war mit der wässrigen Lösung nicht zu erhalten. Die Reaktion mit Asaprol, das in jedem Falle eine starke Trübung und eventuell flockige Ausfällung verursachte, konnte auch von der Seife oder von der phosphorhaltigen Substanz verursacht sein. Außerdem gab die wässrige Lösung des ätherunlöslichen Teiles auf Zusatz von Mineralsäure eine Fällung und färbte nach Erwärmen mit Kalilauge Goldchlorid dunkelviolet, was ebenfalls durch die Anwesenheit von Seife, analog wie bei der von Friboes isolierten Substanz, verursacht sein kann. Die Pettenkofersche Probe wurde in drei darauf untersuchten Fällen erhalten. Da sie aber bekanntlich auch von Phosphatid, Ölsäure usw. gegeben wird, so ist damit ein bindender Beweis für die Anwesenheit von gallensauren Salzen nicht erbracht.

III. Der Eiweißteil.

Die Masse, die im Extraktionszylinder des Soxhlet-Apparates zurückbleibt, besteht aus koaguliertem Eiweiß, aus Natriumsulfat und aus phosphor- und stickstoffhaltigen Restsubstanzen. Nach beendeter Extraktion wurde die Masse mit

Wasser digeriert. Dabei geht das Natriumsulfat in Lösung, und das Eiweiß des Serums bleibt im koagulierten unlöslichen Zustande in dem mit Natriumsulfat gesättigten Wasser. Das Eiweiß wurde durch Filtration von Wasser getrennt, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Die einfache Wägung des Eiweißes könnte durch das eventuell noch beigemengte Natriumsulfat ungenaue Werte ergeben; es wurde deshalb der Stickstoff in einem Bruchteil der Eiweißmasse nach Kjeldahl bestimmt. Phosphor wurde selten und auch dann nur in geringen Mengen nachgewiesen.

Die vom Eiweiß getrennte Natriumsulfatlösung enthielt geringe Mengen Stickstoff, die ebenfalls nach Kjeldahl bestimmt wurden. Außerdem waren immer beträchtliche Mengen Phosphor nachzuweisen. Der letztere ging bei genügendem Zusatz von CaCl_2 zu der mit Kalilauge alkalisch gemachten Flüssigkeit und bei längerem Kochen fast vollständig in den Niederschlag über. Die nähere Untersuchung der in verdünnter HNO_3 löslichen Kalkverbindung ergab, daß es sich wahrscheinlich um organisches Phosphat handelt, da sie beim Glühen stark verkohlte; auch trat beim Erhitzen der Natriumsulfatlösung mit saurer Ammoniummolybdatlösung nur eine Gelbfärbung, aber keine Ausfällung der charakteristischen Phosphormolybdänverbindung ein:

Es wurde in der geschilderten Weise das Serum von 8 Fällen untersucht, nämlich 2 Gesunde, 1 Tabes, 1 Portiocarcinom und 100 ccm Sammelserum von 7 Krebskranken. In den weiteren drei Fällen (zweimal Paralyse und einmal Lues) wurde das Serum von nur 2 Patienten zusammengemischt, bei denen der Gesamtcholesteringehalt des Serums, nach Autenrieth-Funk bestimmt, ungefähr der gleiche war. Bei allen Patienten wurde das Blut in halb nüchternem Zustande durch Venenpunktion erhalten.

Das Natriumsulfat, das zum Trocknen der Sera gebraucht wurde, und die Extraktionshülse wurden immer 12 Stunden lang mit Alkoholäther extrahiert. Außerdem wurde das Natriumsulfat auf Phosphorfreiheit geprüft.

Tabelle I. — Ätherlöslicher Teil.

Diagnose	Nor- mal	Nor- mal	Ca. port. Kachexie	Ca.- Sammel- fall	Lues W +	Para- lyse W +	Para- lyse W +	Tabes W +
Menge des untersuchten Serums in ccm	(200)	(100)	(150)	(100)	(100)	(120)	(100)	(87)
100 ccm Serum enthielten:								
Gesamtlipoid	0,75	0,582	0,561	0,667	0,596	0,592	0,712	0,675
Acetonlöslicher Teil . .	0,304	0,302	0,234	0,400	0,381	0,410	0,421	0,334
Darin:								
Gesamtcholesterin	0,230	0,152	0,168	0,146	0,272	0,146	0,214	0,180
Freies Cholesterin	0,068	0,042	0,061	0,044	0,078	0,112	0,102	0,092
Gebundene Fettsäuren (in ccm n_{10} -NaOH) . .	—	9,5	7,0	7,5	6,6	6,2	8,4	7,5
Freie Fettsäuren (in ccm n_{10} -NaOH)	—	1,8	1,5	2,3	1,4	2,2	1,6	2,1
Acetonunlöslicher Teil . .	0,250	0,175	0,151	0,185	0,202	0,211	0,305	0,225
Darin:								
P ₂ O ₅ in mg	10,12	7,6	5,63	9,76	—	8,92	8,57	8,56
Stickstoff in mg	—	4,2	—	—	5,6	6,4	3,5	5,6
Cholinplatinchlorid	—	0,040	0,032	0,060	0,042	0,098	0,050	0,042
Fettsäuren (in ccm n_{10} - NaOH)	3,2	3,1	1,4(?)	2,8	2,5	2,4	3,1	2,3
Jecorinartiger Körper . .	0,015	0,014	0,019	0,026	0,059	0,010	0,012	0,017

Tabelle II. — Ätherunlöslicher Teil.

Diagnose	Nor- mal	Nor- mal	Ca. port. Kachexie	Ca.- Sammel- fall	Lues W +	Para- lyse W +	Para- lyse W +	Tabes W +
Gewicht	0,5	0,85	0,62	0,75	0,99	0,50	0,80	0,62
P ₂ O ₅ in mg	10,1	—	—	15,2	7,6	—	9,1	—
Cholinplatinchlorid	—	—	0,072	0,050	—	—	0,052	—
Fettsäuren	1,6	—	2,1	4,0	2,2	3,0	3,8	2,5
Aschenalkalescenz in ccm n_{10} -HCl	3,0	9,6	—	5,5	2,8	—	6,8	6,5

Tabelle III. — Eiweißteil.

Diagnose	Normal	Normal	Ca. port. Kachexie	Ca.- Sammel- fall	Lues W +	Para- lyse W +	Para- lyse W +	Tabes W +
Gewicht des Eiweiß- stickstoffes in mg	924,0	929,6	610,4	1086,4	977,2	914,2	907,2	—
Reststickstoff in mg	12,18	17,92	11,2	5,04	11,2	12,6	12,32	14,0
Restphosphor in mg P_2O_5	17,7	11,2	6,2	8,11	17,7	17,6	6,08	—

Die Mengen des freien und gebundenen Cholesterins sind, wie wir aus der Tabelle I ersehen, großen Schwankungen unterworfen. Das Verhältnis vom freien Cholesterin zum gebundenen ist gleich:

bei Normal	68 : 162 = 1 : 2,3
» »	42 : 110 = 1 : 2,6
» Ca. port.	61 : 107 = 1 : 1,8
» » (Sammelf.)	44 : 102 = 1 : 2,3
» Lues	78 : 194 = 1 : 2,5
» Paralyse	112 : 34 = 1 : 0,3
» »	102 : 112 = 1 : 1,0
» Tabes	92 : 180 = 1 : 1,9

Aus dieser Zusammenstellung ersehen wir, daß bei den letzten drei Fällen mit positivem Wassermann parallel mit der eventuellen Vermehrung der Cholesterinester eine noch stärkere Vermehrung des freien Cholesterins stattfindet, sodaß das Verhältnis des freien Cholesterins zum gebundenen, das beim Gesunden im Durchschnitt 1 : 2,5 ist, in einem Fall 1 : 0,3 beträgt. Im Durchschnitt ist das Verhältnis des freien Cholesterins zum gebundenen bei den letzten 4 Fällen mit positivem Wassermann = 1 : 1,4. Man ist zwar nicht berechtigt, anzunehmen, wie es z. B. Peritz, Pighini und Röhman tun, daß der Ausfall der Wassermannschen Reaktion direkt von der Menge der Lipide bzw. des Cholesterins im Serum abhängt; dagegen würde sprechen die Vermehrung des freien Cholesterins bei Diabetes, Nephritis und anderen Erkrankungen mit negativer Wassermannscher Reaktion, die von vielen Autoren konstatiert wurde, einerseits, und andererseits diejenigen Luesfälle mit positiver Wassermannscher Reaktion, bei denen

der Cholesteringehalt des Serums die Norm nicht überragt. Nach neueren Untersuchungen sind es vielmehr andere Bestandteile des Serums, die an dem Ausfall der Wassermannschen Reaktion beteiligt sind (Euglobulinfraktion). Man darf aber den Lipoiden, speziell dem Cholesterin, nicht jede Wirkung absprechen, denn bei der Mehrzahl unserer Luesfälle ist doch eine Vermehrung des freien Cholesterins (nach der Digitoninmethode) zu konstatieren, was angesichts seiner großen serologischen Wirksamkeit von Bedeutung sein kann.

Was die Fettsäuren, die im acetonlöslichen Teil bestimmt wurden, anbelangt, so müssen wir annehmen, daß sie zum größten Teil an das Cholesterin gebunden waren. Der andere Teil, der eventl. als Glycerinfett in diesem Extraktteil vorhanden sein kann, ist jedenfalls viel kleiner. Die oben erwähnte Ausscheidung, die nach dem Erkalten des Alkohols stattfand, konnte immer als Cholesterin-Palmitinsäureester identifiziert werden. Die ermittelten Fettsäurezahlen würden, auf Stearinsäure berechnet, im Durchschnitt ein etwas höheres Gewicht des acetonlöslichen Teiles verlangen. Wahrscheinlich ist die Tatsache mit dem Vorhandensein von niederen gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren zu erklären. Die unbekannten Glycerinfettmengen, die eventl. mit dem Cholesterin zusammengehen und die vielleicht vorkommende unvollkommene Verseifung vereiteln den Versuch, die Digitoninmethode durch die Bestimmung der Fettsäuren zu ergänzen und eventuell zu kontrollieren.

Von den zwei untersuchten Ca.-Fällen weist der erste, der einem kachektischen Individuum entstammt, einen geringeren Lipoidgehalt auf als alle anderen; speziell ist die Menge der acetonunlöslichen Lipoiden verringert. Bei dem zweiten Mischserum, das 7 Krebskranken entstammt, ist dagegen keine Herabsetzung der Lipoidmenge zu konstatieren.

Bei den letzten vier Fällen mit positivem Wassermann finden wir außer der oben besprochenen Vermehrung des freien Cholesterins eine allerdings geringe Vermehrung der acetonunlöslichen Lipoiden.

Im übrigen kann man ersehen, daß die Menge der Lipoiden auch in den verschiedenen Gruppen schwankt, was besonders

bei den zwei ersten Seren, die normalen Individuen entstammen, auffällt; während der erste Fall einen großen Reichtum an Lipoiden aufweist, finden wir beim zweiten viel geringere Werte bei beiderseitig etwa gleichem Eiweißgehalt.

Ein spezielles Interesse beanspruchen die hohen Phosphorzahlen im wasserlöslichen Teil (Tabelle III), welche dem Lecithinphosphor mindestens gleichkommen. Es ist uns vorläufig unmöglich, ein definitives Urteil über die Genese dieses in allen Fällen konstatierten Phosphoranteiles abzugeben. Besondere Beachtung wurde übrigens dem in den gewöhnlichen Lipoidsolventien unlöslichen Phosphor in der Arbeit von J. Greenwald geschenkt, der eine Steigerung dieses im Serum parathyreoidektomierter Hunde vorfand.

Zusammenfassung.

Die nach der Methode von Autenrieth und Funk untersuchten Sera gesunder Menschen enthielten durchschnittlich 177 mg Gesamtcholesterin in 100 ccm Serum, das Serum Carcinomatöser 174 mg; bei zwei Dritteln der Lueskranken war eine Vermehrung bis zu 320 mg zu konstatieren; die Durchschnittszahl beträgt bei ihnen 239 mg in 100 ccm Serum.

Außerdem wurden Lipoidbestimmungen in größeren Mengen Serum vorgenommen. Der Gang der Untersuchung war dabei folgender:

Das Serum wurde nach verschiedenen Vorversuchen nach der Methode von Fränkel und Elfer, die sich sehr zweckmäßig erwies, vorbereitet. Als rasch erschöpfendes Extraktionsmittel wurde eine Mischung von Alkohol und Äther (2:1) angewandt.

Der mit wasserfreiem Äther aufgenommene Extrakt läßt einen ätherunlöslichen Teil zurück, der in der Hauptsache, außer den mitgeschleiften Salzen, noch Seife, alkohollösliches Phosphatid und geringe Mengen von abiureten, aber mit Ninhydrin reagierenden Substanzen enthält.

Die ätherlösliche Portion kann mittels mehrmaliger Acetonfällung in einen acetonunlöslichen, den phosphatidhaltigen Teil, und einen das freie und gebundene Cholesterin enthaltenden

acetonlöslichen Teil getrennt werden. Als konstante Begleit-substanz des Phosphatids konnte immer eine jecorinartige Substanz, deren Reduktionsvermögen gegen Fehling gering war, die aber ammoniakalische Silberlösung weinrot färbte, isoliert werden.

Das Eiweiß des Serums konnte zurückgewonnen und bestimmt werden, indem die extrahierte Masse durch Auslaugen mit Wasser vom Natriumsulfat befreit wurde. In dem durch Filtration vom koagulierten Eiweiß geschiedenen wässerigen Auszuge wurden außer dem Reststickstoff noch beträchtliche Mengen Phosphor in organischer Bindung nach Neumann nachgewiesen.

Bei den auf diese Weise untersuchten Seren von normalen Individuen war das Verhältnis des (nach der Digitoninmethode ermittelten) freien Cholesterins zu dem gebundenen im Durchschnitt gleich 1 : 2,47; bei den Fällen mit positivem Wassermann stieg in drei von vier Fällen der Gehalt an freiem Cholesterin, sodaß das Verhältnis in einem Fall zu 1 : 0,3 gefunden wurde. In dem einen Ca.-Fall (blumenkohlartiges Ca. port., Kachexie 150 ccm Serum) ist eine auffallende Verminderung aller Lipoidanteile zu konstatieren. Das andere Mischserum, das 7 ambulanten Patienten entstammt, weist dagegen ziemlich hohen Lipoidgehalt auf.

Die großen Mengen pathologischer Sera, die in vorliegender Arbeit zur Untersuchung gelangten, entstammen Patienten des Samariterhauses (Dir. Exzell. Czerny), der med. Poliklinik (Dir. Geh. Rat Fleiner), der Hautklinik (Dir. Prof. Dr. Bettmann), der psychiatr. Klinik (Dir. Geh. Rat Nissl) und der Frauenklinik zu Erlangen (Dir. Prof. Dr. Seitz). Den genannten Herren Institutsleitern danken wir verbindlichst für ihr liebenswürdiges Entgegenkommen. Zu besonderem Dank sind wir Sr. Exzellenz für die liberale Zuweisung der Hilfsmittel des chemischen Laboratoriums des Krebsinstitutes und für das Interesse an den angeregten Fragen verpflichtet.

Literaturverzeichnis.

Aschoff, Dermatol. Stud., Bd. 21.

Autenrieth und Funk, Münch. Med. Wochenschr., Bd. 69, 1913, S. 1243.

- Bacmeister, Münch. Med. Wochenschr., 1908, Nr. 5, 6, 7.
 » Biochem. Zeitschr., 1910, Bd. 26.
 Baldi, Archiv f. Anatomie u. Physiol., 1887, Suppl., S. 100.
 Bang, J., Chemie und Biochemie der Lipotide, S. 25, Wiesbaden 1911.
 Bauer und Skutezky, Wiener Klin. Wochenschr., Bd. 26, 1913, S. 830.
 Burchard, H., Beiträge zur Kenntnis der Cholesterine, Diss. Rostock, 1889.
 Bürger und Beumer, Berliner Klin. Wochenschr., Bd. 50, 1913, S. 112.
 Chauffard, Laroche et Grigaut, Compt. rendus de la Soc. de Biol., 1911, S. 536.
 Cohn, Chem. Beiträge, Bd. 37, 1913, S. 581.
 Dezani, Chem. Zentralblatt, 1913, S. 1765.
 Doree, Gardner, Fraser and Elliss, Proceedings of the Royal Society of London, Biology 1908—1912.
 Ehrmann und Kruspe, Berliner Klin. Wochenschr., 1913, Nr. 24.
 Fingerling, Biochem. Zeitschr., Bd. 38, S. 448.
 Fränkel, Sigmund, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, Bd. 5, S. 1.
 » » und Elfer, Aladar, Biochem. Zeitschr., Bd. 28, S. 330, 1910.
 Friboes, Deutsche Med. Wochenschr., 1914, Nr. 12, S. 598.
 Goodman, Beitr. z. chem. Physiol., Bd. 9, 1907.
 Greenwald, J., Journ. of Biol. Chemie, Bd. 14, S. 369—79.
 Gregersen, Diese Zeitschrift, Bd. 71, 1912, S. 409.
 Grigaut, A., Soc. de Biologie, 1912, Bd. 64, S. 400, 912; Bd. 63, S. 441.
 » et L'Huillier, Soc. de Biologie, 1912, S. 220.
 » Laroche, Chauffard et Righet, Soc. de Biol., 1911.
 Grün und Kade, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 45, 1913, S. 3367.
 Henes, E., Deutsch. Arch. f. Klin. Med., Bd. 111, 1913, S. 122.
 Hepburn, Chemisches Zentralblatt, 1913.
 Hepner, Pflügers Archiv f. Physiol., Bd. 73, S. 95.
 Hermann und Neumann, Wien. Klin. Wochenschr., 1911, Nr. 12; Biochemische Zeitschr., Bd. 43.
 Hoppe-Seyler-Thierfelder, Lehrbuch der Chem. Analyse, 7. Aufl.
 Hürtle, Diese Zeitschrift, Bd. 21, 1895, S. 331.
 Iscovesco, La Presse médicale, 1908; Soc. de Biologie, 1907.
 Kauders, Biochem. Zeitschr., Bd. 55, S. 96.
 Klinkert, Berliner Klin. Wochenschr., 1913, S. 820.
 Kumagawa und Suto, Biochem. Zeitschr., Bd. 8, 1908, S. 212.
 Letsche, Diese Zeitschrift, Bd. 53, 1907, S. 31.
 Lifschütz, J., Diese Zeitschrift, Bd. 53, 1907, S. 140.
 Mac-Lean, Biochem. Zeitschr., Bd. 57, S. 132.
 Moritz, Archiv f. klin. Med., Bd. 84, S. 346.
 Neuberg und Rauchwerger, Diese Zeitschrift, Bd. 47, S. 385.
 Obakewitsch, Russki Wratsch, 1913, Nr. 30, 31, 32.
 Paal und Oehme, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 46, 1913, S. 1297.

- Pighini, Zeitschr. f. gesamte Neurol. u. Psych. 1912.
Pribram, Prag. Med. Wochenschr., Bd. 37, 1912, Nr. 17.
Reicher, K., Zentralbl. f. inn. Med., 1912, S. 569.
 » Münch. Med. Wochenschr., 1913, S. 1053.
Röhl, Zentralbl. f. inn. Med., 1912, S. 568. — Stepp und Heubner,
 ebenda.
Röhmman, Berliner Klin. Wochenschr., Bd. 49, 1912, Nr. 42.
Stanford, Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 159.
Schulz, Biochem. Zeitschrift, Bd. 42, S. 255.
Stuber, B., Biochem. Zeitschrift, Bd. 53, S. 493.
Thar, Biochem. Zeitschrift, Bd. 58, S. 503.
Thaysen, Biochem. Zeitschrift, Bd. 62, 1914.
Trier, Diese Zeitschrift, 1912, Bd. 76, S. 496.
Wacker und Hueck, Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmakol., 1913, Bd. 74,
 S. 417.
Weltmann, Wiener Klin. Wochenschr., Bd. 26, 1913, S. 879.
Widal, Weil et Laudat, La Semaine méd., 1912, Bd. 45, S. 524.
Wieland und Weil, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellschaft., 1913, Bd. 46.
Windaus, Diese Zeitschrift, Bd. 65, S. 110; Ber. d. Deutsch. chem. Ge-
 sellschaft, 1909, Bd. 42, S. 238.
-