

# Über die quantitative Bestimmung der Katalasen im Blute.

Von

**Adolf Jolles.**

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. M. und Dr. A. Jolles in Wien.)

Die chemische Analyse physiologischer Produkte bezweckt, aus der chemischen Zusammensetzung Schlüsse auf die physiologische Wirkung innerhalb des Organismus zu ziehen, oder durch Konstatierung der Abweichungen vom normalen Werte Anhaltspunkte für die Beurteilung der pathologischen Veränderungen zu erhalten. Die Auffindung eines neuen Stoffes im Organismus oder die Entdeckung, dass ein bisher für unwichtig gehaltener Bestandteil wichtige Funktionen ausübt, ist immer der Anlass zur Ausarbeitung einer Bestimmungsmethode für den betreffenden Körper. So erschien es auch jetzt angebracht, wo die Bedeutung der Fermente für die Physiologie immer mehr und mehr in den Vordergrund tritt, Versuche über die Bestimmung der Blutfermente anzustellen, zumal die von mir vor einiger Zeit erfolgte Untersuchung über die Bestimmung der Katalase in der Milch<sup>1)</sup> günstige Resultate ergeben hatte; ferner war es anzustreben, der Untersuchungsmethode eine möglichst einfache, klinisch verwendbare Form zu geben.

Die Fermente sind bekanntlich nichts anderes als Katalysatoren, das heisst Substanzen, welche Reaktionen beschleunigen oder verzögern ohne mit der Menge des umgesetzten Produktes in stöchiometrischer Beziehung zu stehen. Die Fermente zeigen meistens eine im Verhältnis zu ihrer Menge ungeheuer grosse Wirksamkeit.

Nach den Reaktionen, welche sie herbeiführen, unterscheidet man folgende Gruppen:

1. Hydrolytische Enzyme.
2. Autolytische Enzyme.

---

<sup>1)</sup> Beiträge zur Kenntnis der Frauenmilch. Von A. Jolles, Zeitschrift für Biologie, Bd. XLV.

3. Gerinnungsenzyme.

4. Oxydasen, das sind jene Enzyme, welche Oxydationsvorgänge beschleunigen, und die man als Sauerstoff-Ueberträger bezeichnen kann.

5. Katalasen, das sind jene Fermente, welche die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds bewirken.

Oxydasen und Katalasen kommen im tierischen Organismus stets neben einander vor.

Wie aus Versuchen, die an anderer Stelle zur Publikation gelangen, hervorgeht, dürfte zwischen der Intensität der Oxydation im Organismus und dem Katalasengehalte des Blutes ein Zusammenhang bestehen; infolge dessen erschien es wünschenswert, über ein Verfahren zur Bestimmung der Katalasen im Blute zu verfügen.

Die Fermente sind sämtlich Kolloide und ihre chemische Konstitution ist völlig unbekannt. Durch die meisten Reagenzien, ebenso wie durch Fällung und Temperaturveränderung, werden sie in der Regel derart unwirksam gemacht, dass eine Reindarstellung oder Bestimmung nach den üblichen maß- oder gewichtsanalytischen Methoden derzeit ausgeschlossen erscheint. Auch eine Bestimmung durch eventuelle Abbauprodukte ist aussichtslos, da sie immer in Begleitung einer grossen Zahl anderer Substanzen vorkommen; deren chemischer Charakter ebenfalls unsicher ist. Es verbleibt somit als Bestimmungsmethode für die Fermente die Messung der Wirkungen, die sie hervorbringen, also hier die Messung des Wasserstoffsuperoxyds, welches das Ferment unter bestimmten Bedingungen zerlegt. Diese Wirkung ist abhängig von der Dauer der Einwirkung, der Temperatur, den Zusätzen zum Reaktionsgemisch, der Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds und des Fermentes. Hält man alle Grössen konstant bis auf die zu messende Fermentmenge, so ist das zerlegte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Quantum nur mehr abhängig von der Menge des Fermentes, und man kann derart verschiedene Blutproben mit Bezug auf ihre Fermentmengen vergleichen. Es ist hier zu betonen, dass Fermentkonzentration und Wirkung nicht mathematisch proportional sind, dass z. B. die dreifache Fermentkonzentration nicht die dreifache Wirkung hervorbringen muss, da es sich, wie bereits gesagt, nicht um stöchiometrische Verhältnisse handelt. Immer bewirkt aber Zunahme der Fermentkonzentration Zunahme der Wirkung, und man kann auf diese Weise gut reproduzierbare und vergleichbare Resultate erhalten. Die Bestimmungsmethode ist im Grunde genommen nichts anderes als die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit, welche das Ferment in

einem nach der Zusammensetzung und den äusseren Bedingungen genau definierten System hervorbringt.

Das Verfahren, das ich in Gemeinschaft mit dem klinischen Assistenten Dr. Oppenheim ausgearbeitet habe, besteht darin, dass das Blut in bestimmter Verdünnung auf eine bestimmte Menge Wasserstoffsuperoxyd 2 Stunden einwirkt. Durch die Messung des danach noch vorhandenen Wasserstoffsuperoxyds erhält man die Menge, welche in der Zeit der Einwirkung durch die Katalase des Blutes zerlegt wurde. Durch eine Anzahl von Versuchen wurden die Bedingungen ermittelt, welche ein möglichst sicheres Arbeiten erlauben, so dass sich als endgiltiges Resultat folgendes Verfahren ergab, nach dem auch alle Versuche durchgeführt wurden:

1. Die Entnahme der Blutproben erfolgt in der Art, dass mittels des Stechers an der Fingerbeere oder am Ohr läppchen seitlich ein kräftiger Einstich gemacht wird, worauf man mit der Kapillarpipette 0,05 cc ansaugt. Man vermeidet hierbei den Eintritt von Luftblasen und bläst den Pipetteninhalt quantitativ in ein 50 cc-Kölbchen aus, in welchem sich etwa 30 cc physiologische Kochsalzlösung (0,9 %) befinden, spült die Pipette mit der physiologischen Kochsalzlösung nach, füllt schliesslich mit solcher bis zur Marke auf und schüttelt vorsichtig durch. Von der so erhaltenen Blutlösung wurden stets 10 cc mit  $H_2O_2$ -Lösung versetzt.

2. Herstellung der Wasserstoffsuperoxydlösung. Das zur Reaktion verwendete Wasserstoffsuperoxyd muss 1 %  $H_2O_2$  enthalten und vollkommen neutral sein, da auch geringe Säuremengen die Katalase wesentlich hemmen; es wird zu diesem Zwecke in käuflichem, reinem, zirka 3 prozentigem Wasserstoffsuperoxyd zunächst die Säure mit  $\frac{n}{10}$  Natronlauge unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator neutralisiert. Die Gehaltsbestimmung des  $H_2O_2$  geschieht durch Titration mit Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung; der Titer des Permanganats wird mit Hilfe von Oxalsäure, beziehungsweise Natriumoxalat, bestimmt. Entsprechend dem gefundenen Gehalte an  $H_2O_2$  wird nun mit Wasser soweit verdünnt, bis man eine 1 prozentige  $H_2O_2$ -Lösung erhält, worauf man die Richtigkeit der angewendeten Verdünnung durch eine neuerliche Titration feststellt.

Zur Bestimmung des Wirkungswertes der  $H_2O_2$ -Lösungen kann man sich selbstredend auch der jodometrischen Methode bedienen, indem man die erwähnte Lösung in einer Stöpselflasche mit konzentrierter

Salzsäure versetzt, Jodkaliumlösung zutropft, nach einigem Stehenlassen verdünnt und nach Zusatz von Stärkekleister mit Hyposulfitlösung titriert. Jedoch ist die Permanganatmethode expeditiver.

3. Herstellung der Hyposulfitlösung zur Bestimmung des durch die Katalasen nicht zersetzten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Überschusses. Man löst ungefähr 25 g krystallisiertes Natriumhyposulfit in einem Liter Wasser. Andererseits bereitet man eine Lösung von 3,874 g reinstem Kaliumbichromat in einem Liter Wasser; 20 cc dieser Lösung entsprechen 0,201 g Jod. Von der letztgenannten Lösung bringt man 20 cc in eine Stöpselflasche, fügt 10 cc einer zirka 10prozentigen Jodkaliumlösung zu, verdünnt nach etwa 5 Minuten mit 100 cc Wasser und titriert das ausgeschiedene Jod mit der oben angegebenen Hyposulfitlösung nach Zusatz von Stärkekleister als Indikator. Verbraucht man 15,8 cc Hyposulfitlösung, so ist 1 cc derselben gleich  $\frac{0,201}{15,8} = 0,0127$  g Jod oder 0,0017 g  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

4. Ausführung der Reaktion. 10 cc der Blutlösung werden mit 30 cc der Wasserstoffsuperoxydlösung vermischt, bei zirka 15° C., das heisst bei Zimmer-Temperatur, 2 Stunden lang stehen gelassen, hierauf wird mit Salzsäure (10 cc konzentrierte Salzsäure, spezifisches Gewicht 1,19) angesäuert und allmählich unter Umschwenken Jodkaliumlösung (20—25 cc 10-prozentige Jodkaliumlösung) hinzugefügt, wobei sofort eine Jodausscheidung eintritt; man lässt eine Stunde stehen und titriert das Jod mit der angegebenen Thiosulfatlösung in bekannter Weise zurück. Die Differenz zwischen dem so gefundenen Wert und dem ursprünglichen Titer der Wasserstoffsuperoxydlösung gibt die Menge  $\text{H}_2\text{O}_2$  an, welche von der angewendeten Blutmenge — 0,01 cc — zersetzt wurde; die Resultate haben wir stets auf 1 cc Blut bezogen.

Die Temperatur während der Reaktion soll etwa 15° C. betragen; geringe Abweichungen in der Temperatur haben nur wenig Einfluss auf das Resultat, dagegen ergeben viel tiefere und viel höhere Temperaturen ganz verschiedene Resultate. Das Blut soll im frischen Zustande zur Verwendung kommen, da bei längerem Stehen die Katalase teilweise zerstört wird. Als Dauer der Einwirkung ist die Zeit vom Zusammenbringen der Reagenzien bis zum Ansäuern zu betrachten, da durch Säurezusatz die Wirkung der Katalase gehemmt wird und von diesem Zeitpunkte an die Zersetzung nicht mehr fortschreitet. Falls man die Rücktitration mit Permanganat vornehmen

will, — in welchem Falle statt mit Salzsäure mit Schwefelsäure (10 cc Schwefelsäure 1 : 1) angesäuert wird — ist die Methode insofern mit einer Fehlerquelle behaftet, als die im Blute enthaltenen Eiweissstoffe Sauerstoff verbrauchen können, wodurch eine Veränderung des gefundenen Titers des Wasserstoffsuperoxyds erfolgt. Nun ist aber dieser Fehler in Anbetracht der geringen Blutmenge (0,01 cc) im Vergleich zum zersetzten Wasserstoffsuperoxyd gering und ferner bei sämtlichen Bestimmungen in gleicher Weise vorhanden, so dass er die Brauchbarkeit der Methode, die ja nur relative Werte ergibt, nicht wesentlich beeinträchtigen kann. Bei der Rücktitration des  $H_2O_2$  mit Jod, respektive unterschwefligsaurem Natron, fallen auch diese Bedenken weg, und Oppenheim und ich haben alle Bestimmungen auf jodometrischem Wege durchgeführt. Als Bezeichnung sei hier vorgeschlagen, die Anzahl von Grammen Wasserstoffsuperoxyd, welche 1 cc Blut unter den angegebenen Bedingungen: — 0,01 cc Blut auf 10 cc verdünnt, 30 cc einprozentige Wasserstoffsuperoxydlösung, zirka 15° C., Dauer 2 Stunden — zersetzt, „Katalasenzahl“ zu benennen.

Die Katalasenzahl beträgt beim normalen Blut zwischen 18 und 30, die meisten Werte liegen zwischen 20 und 26. Arteriellcs und venöses Blut, ebenso solches von männlichen und weiblichen Individuen zeigt keine Differenzen.

Nachdem wir festgestellt hatten, dass das Blut Gesunder einen ziemlich konstanten Gehalt an Katalasen enthält, gingen wir daran, das Blut Kranker zu untersuchen.

Im Ganzen wurden 27 Fälle untersucht, 15 Männer und 12 Frauen.

Aus der Untersuchung dieser pathologischen Fälle, über welche an anderer Stelle berichtet wird, geht hervor, dass in Krankheiten die Wasserstoffsuperoxyd-Zersetzungsgrösse des menschlichen blutes bedeutend herabgesetzt sein kann. Es scheint, dass Tuberkulose, Nephritis und Karzinom ganz besonders diese Grösse herabsetzen.

---