

(Aus der Universitäts-Nervenklinik München [Direktor: Prof. *Bumke*.])

Studien zur pathologischen Physiologie des Liquor cerebrospinalis.

II. Mitteilung.

Die Trennung der hoch- und niedermolekularen Substanzen im Liquor durch Mikrodialyse.

Von
K. F. und L. Scheid¹.

Mit 7 Textabbildungen.

(*Ein eingegangen am 11. November 1943.*)

Die Dialyse stellt eines der wichtigsten Verfahren zur Abtrennung niedermolekularer Substanzen von hochmolekularen dar. Die Zahl der angegebenen Apparaturen in Makro- und Mikroform in Chemie und Biologie ist beträchtlich. Die meisten dieser Versuchsanordnungen genügen aber höheren Ansprüchen nicht. Dies gilt vor allem für die Collodiumsäckchen oder die Cellophanhülsen, die auch in der Liquorforschung bisher allgemein gebräuchlich waren. Da sich im Laufe unserer Liquorstudien immer wieder die Notwendigkeit einer exakten Trennung der hochmolekularen Substanzen von den niedermolekularen in der Cerebrospinalflüssigkeit ergab, wurde von uns eine besondere Apparatur entwickelt, und zwar auf Grund theoretischer Überlegungen nach *quantitativen* Gesichtspunkten. Diese Apparatur gestattet eine saubere Trennung der Kolloide von den Nichtkolloiden im Liquor; die Zeitdauer, die für eine solche Trennung erforderlich ist, kann genau bestimmt werden, und es ist sogar eine annähernde quantitative Schätzung des durchschnittlichen Molekulargewichts der dialysablen Stoffe möglich. Im praktischen Betrieb ist uns die Apparatur unentbehrlich geworden.

a) Wir beginnen mit der Besprechung der *theoretischen Grundlagen der Dialyse*. Das wichtigste Element jeder Dialyseanordnung ist die Membran. Die früher fast ausschließlich verwandten Pergament- und Kollodiummembranen sind heute überholt, da sie sich nur unter besonderen Verhältnissen so herstellen lassen, daß reproduzierbare Versuchsbedingungen zu erwarten sind. So ist es z. B. *Elford*² gelungen, derartige Membranen mit gestufter Porengröße zur Messung der Dimensionen von Viruselementen anzufertigen. Ebenso sind Eiweißmembranen gelegentlich in Gebrauch. Praktisch kommen aber heute nur noch fabrikmäßig hergestellte Membranen aus Cellulose oder Celluloseestern in Betracht. Eine solche

¹ Frl. *E. Strauß*, technische Assistentin an der Universitäts-Nervenklinik in München, sind wir für die gewissenhafte Ausführung der zahlreichen Versuche dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

² *Elford*: Handbuch der Virusforschung. Wien 1938.

Membran stellt ein dreidimensionales Netzwerk aus den Hauptvalenzketten der Glucosebausteine in der Cellulose dar. Diese Hauptvalenzketten tragen Seitengruppen, bei der Cellulose hauptsächlich die OH-Gruppen der Glucose, an die sich Wasserdipole anlagern und die für die hydrophilen Eigenschaften, also die Quellung der Membran verantwortlich zu machen sind. Außerdem finden sich in der Cellulose COOH-Gruppen, die einen „sauren“ Charakter der Cellulose bedingen, aber so gering an Zahl sind, daß praktisch jedenfalls eine Cellulosemembran als neutral bezeichnet werden kann. Durch dieses Netzwerk diffundieren nun die Wassermoleküle und die gelösten Teilchen, getrieben von ihrer Wärmebewegung. Sind die Maschen größer als die diffundierenden Partikel (einschließlich ihrer Hülle aus Wasserdipolen), so tritt keine wesentliche Behinderung ein. Nähert sich die Abmessung der Lücken zwischen dem Netzwerk der eines diffundierenden Teilchens, dann verlangsamt sich dessen Beweglichkeit, so daß bei großem Mißverhältnis zwischen den Abmessungen des Teilchens und der Pore dieses überhaupt nicht mehr durch die Membran gelangen kann. Wir nennen diese Behinderung den Siebeffekt. Bei der Diffusion elektrisch geladener Teilchen kommen noch elektrische Erscheinungen zu dem Siebeffekt hinzu. So können z. B. die negativ geladenen COOH-Gruppen des Netzwerks gleichartig geladene Partikel abstoßen und in ihrer Wanderung behindern. Das kann so weit gehen, daß diese Teilchen, trotzdem sie eine den Poren der Membran entsprechende Größe haben, nicht mehr durchgelassen werden. Die Membran ist dann anionenundurchlässig, während sie für die entgegengesetzt geladenen Ionen gut permeabel sein kann. Bei unseren Cellulosemembranen mit ihren wenigen COOH-Gruppen spielt, wie schon angedeutet, dieser Effekt kaum eine Rolle¹.

Der beschriebene Vorgang der Dialyse wird durch eine Formel beherrscht, die *Brintzinger* aufgestellt hat und die wenigstens näherungsweise gilt:

$$c_t = c_0 e^{-\lambda t} \quad \dots \quad (1) \quad \text{oder} \quad \lambda = \frac{1}{t \cdot 0,4343} (\log c_0 - \log c_t) \quad \dots \quad (2)$$

Hierbei bedeutet c_0 die Konzentration des dialysierenden Stoffes zu Beginn der Dialyse, c_t seine Konzentration zur Zeit t , e die Basis des natürlichen Logarithmensystems und λ den sog. Dialysekoefizienten, der außer von der Temperatur und der Größe der Membranfläche vor allem vom Molekulargewicht der dialysierten Substanz abhängt. Diese letztere Beziehung läßt sich nach *Brintzinger* in das Gesetz fassen:

$$\lambda \cdot \sqrt{M} = \text{konst.} \quad \dots \quad (3)$$

d. h. die Dialysekoefizienten der einzelnen Stoffe verhalten sich umgekehrt wie die Quadratwurzeln aus den Molekulargewichten.

Die Gültigkeit der Gesetze von *Brintzinger* ist an bestimmte Voraussetzungen gebunden:

1. Es muß für ausreichende Rührung gesorgt werden, so daß die Konzentration innerhalb des Dialysegefäßes in allen seinen Abschnitten in einem bestimmten Augenblick gleich ist. Die Konzentration des durchtretenden Stoffes in der Außenflüssigkeit muß Null sein.

2. Es darf keine Behinderung des diffundierenden Teilchens in den Maschen der Membran, sei es infolge seiner Größe, sei es infolge elektrischer Effekte, auftreten. *Jander* und *Spandau* sowie *Spandau* und *Gross* fanden, daß eine solche Behinderung schon bei verhältnismäßig niedermolekularen Stoffen (Traubenzucker) eintritt, so daß das oben erwähnte Wurzelgesetz nicht mehr exakt zutrifft. Auf jeden Fall ist aus diesen Einschränkungen der Schluß zu ziehen, daß bei der Dialyse auch dann, wenn keine exakten Molekulargewichtsbestimmungen nach dem Wurzelgesetz beabsichtigt sind, unbedingt Membranen annähernd reproduzierbarer Porengröße verwandt werden sollten.

¹ Eine gute Übersicht über Membranprobleme findet sich bei *K. H. Meyer*: Die Hochpolymeren Verbindungen. Leipzig 1940.

Aus dem *Brintzingerschen* Gesetze ergeben sich noch andere Forderungen, die beim Bau einer quantitativ arbeitenden Dialyseapparatur zu berücksichtigen sind:

3. Die Membranfläche, die für die Dialyse wirksam ist, soll eine konstante Größe haben, da λ von dieser Größe abhängt. Dies ist praktisch nur durch *plane* Membranen zu erreichen. Hülsen oder Säckchen lassen sich nur schwer so herstellen und füllen, daß reproduzierbar immer die gleiche Fläche bei der Dialyse maßgebend ist.

4. Wegen der Temperaturabhängigkeit von λ ist der Endpunkt der Dialyse ebenfalls temperaturabhängig. Konstanz der Dialysetemperatur ist also ebenfalls eine Voraussetzung für quantitatives Arbeiten.

Endlich sind noch zwei weitere Gesichtspunkte zu berücksichtigen:

5. Zur Vermeidung von Bakterienwachstum und von Denaturierungsvorgängen insbesondere an den hochempfindlichen Eiweißkörpern muß die Dialysetemperatur so niedrig wie möglich, jedenfalls unter Zimmertemperatur, gehalten werden. Einbau eines Kälteaggregates in die Apparatur ist mithin dringend zu empfehlen.

6. Das Volumen der zu dialysierenden Flüssigkeit darf sich während des Versuchs nicht ändern. Bei Eiweißlösungen höherer Konzentration muß beim quantitativen Arbeiten dieser Umstand sorgfältige Berücksichtigung finden, da infolge des kolloidosmotischen Druckes dieser Substanzen Wasser in den Innenraum des Apparates hineindiffundiert. Bei den geringen Mengen von Eiweiß im Liquor spielen diese Verhältnisse praktisch jedoch keine Rolle. Dagegen muß dafür Sorge getragen werden, daß während des Versuchs das Niveau der Innen- und Außenflüssigkeit gleich bleibt. Am besten läßt sich dies durch eine besondere Konstruktion der Dialysegefäß erreichen. Diese sind bis auf einen dünnen hohlen Stiel, an dem eine Marke angebracht ist, geschlossen. Das ganze Gefäß läßt sich dann bis zur Marke in die Außenflüssigkeit einensenken und genau justieren. Sollte die Innenflüssigkeit dennoch über die Marke steigen oder unter sie fallen, so ist der hierdurch verursachte Fehler wegen der Dünnskalibrigkeit des Ansatzrohres sehr gering.

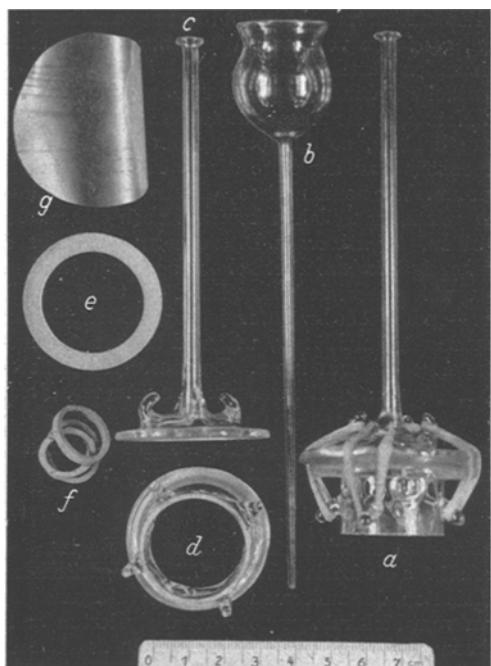


Abb. 1. *a* Das Gefäß zusammengesetzt, *b* Einfülltrichter, *c*—*g* die einzelnen Teile des Gefäßes: *c* Oberteil, *d* Unterteil, *e* Glasring, *f* Gummiringe, *g* Membran.

diffundiert. Bei den geringen Mengen von Eiweiß im Liquor spielen diese Verhältnisse praktisch jedoch keine Rolle. Dagegen muß dafür Sorge getragen werden, daß während des Versuchs das Niveau der Innen- und Außenflüssigkeit gleich bleibt. Am besten läßt sich dies durch eine besondere Konstruktion der Dialysegefäß erreichen. Diese sind bis auf einen dünnen hohlen Stiel, an dem eine Marke angebracht ist, geschlossen. Das ganze Gefäß läßt sich dann bis zur Marke in die Außenflüssigkeit einensenken und genau justieren. Sollte die Innenflüssigkeit dennoch über die Marke steigen oder unter sie fallen, so ist der hierdurch verursachte Fehler wegen der Dünnskalibrigkeit des Ansatzrohres sehr gering.

b) Die *Dialyseapparatur* ist schon in der vorigen Mitteilung kurz beschrieben worden: Die *Glasgefäß* bestehen aus einem glockenförmigen Oberteil (*c*) mit einem am höchsten Punkt der Glocke angesetzten Stiel aus einem dünnkalibrigen Glasrohr und aus einem ringförmigen Unterteil (*d*). (Abb. 1). Zwischen beide wird die Membran (*g*) horizontal

eingespannt. Zur Vergrößerung des Dialysevolumens kann noch ein Glasring (*e*) zwischen Membran und Oberteil eingelegt werden. Die aufeinanderliegenden Glasteile sind geschliffen, die Schlitte werden leicht mit Paraffin-Vaseline gefettet. An Ober- und Unterteil sind einige Glasdorne angebracht, über die Gummiringe geschoben werden. Auf diese Weise werden die Teile des ganzen Gefäßes unter mäßigen Druck zusammengepreßt und dichtgehalten. Nach Zusammensetzung wird die Dialysierzelle mit dem Dialysegut gefüllt, und zwar mit Hilfe eines kleinen langgestielten Trichters (*b*), dessen Stiel durch das Glasrohr des Oberteils bis dicht oberhalb der Membran geführt wird, so daß keine Luftblasen beim Eingießen auftreten. Das Gefäß faßt mit eingelegtem Glasring etwa 6,5 ccm, ohne ihn etwa 5,0 ccm.

Als *Membran* eignen sich ausschließlich entsprechend zurechtgeschnittene Stücke der Dialysierschläuche von Kalle & Co., Biebrich (Nr. 272/15), welche die oben ausführlich erörterten Eigenschaften, die zu fordern sind, besitzen. Andere Membranen wie Cellophan oder Kuprophan sind nicht brauchbar, da sich mit ihnen, offenbar infolge ungenügender Quellung, kein eiweißdichter Abschluß erzeugen läßt. Die Membranen wurden im allgemeinen trocken eingespannt. Hierdurch kommt ein kleiner, praktisch aber nicht ins Gewicht fallender Fehler zu Beginn des Versuches in die quantitative Auswertung.

Mehrere der gefüllten Dialysiergefäße werden nun in einen Bürettenhalter (Abb. 2) eingeklemmt, bis zur Marke an dem Stiel des Oberteils in die Außenflüssigkeit eingesenkt. Dann wird der Bürettenhalter (*b*) mit Hilfe eines Elektromotors angetrieben und auf diese Weise mit den Dialysiergefäßen in Rotation versetzt. Hierdurch kommt es zu einer ausreichenden Rührung sowohl der Außenflüssigkeit als auch des Dialysegutes innerhalb der Zellen, da hier die Flüssigkeit ebenfalls rotiert. Das Kälteaggregat ist an den Eisschrank angeschlossen, und seine Kühlslange kühlt einen großen mit Methanol gefüllten geschlossenen Bottich aus Kupfer (*k*). Das Gefäß für die Außenflüssigkeit (*a*), in das die Dialysierzellen eingesenkt werden, steht von einer Solelösung umgeben, in einer Vertiefung des Kupferbottichs. Naturgemäß läßt sich die Kühlvorrichtung auch anders gestalten. Unsere Anordnung ergab

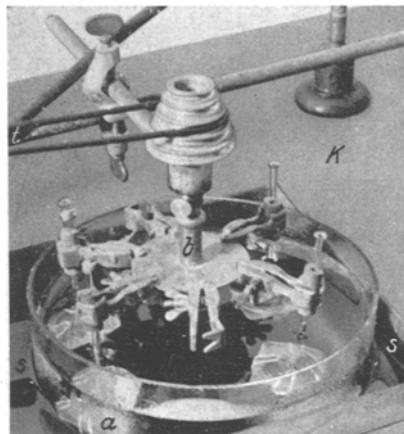


Abb. 2. Die Dialysierapparatur. *b* Bürettenhalter mit Gefäß, *t* Treibriemen zum Elektromotor, *a* Gefäß für die Außenflüssigkeit, *s* Sole, die sich in einer Vertiefung des Kupferbehälters *k* befindet, der mit Hilfe eines Kälteaggregates gekühlt wird.

sich deswegen in der beschriebenen Weise, weil das gekühlte Methanol noch zu anderen Zwecken, insbesondere zur Durchströmung von Apparaturen gebraucht wird. Die Dialysetemperatur beträgt in unseren Versuchen 2—6°. Dies ist für unsere Zwecke ausreichend. Eine bessere Temperaturkonstanz bis auf wenige Zehntel Grad läßt sich durch Einbau eines Kontaktthermometers ohne weiteres erreichen.

c) *Die Prüfung der Dialysegefäße* auf ihre Brauchbarkeit für die quantitative Auswertung erfolgte mit bekannten Substanzen von bekanntem Molekulargewicht. Die betreffenden Substanzen wurden in Pufferlösung (Phosphatpuffer mit einem p_{H} von etwa 8,0) gelöst, die Dialysiergefäße mit dieser Lösung gefüllt. In bestimmten Zeitabständen konnte dann jeweils eines der Gefäße aus der Apparatur herausgenommen und sein Inhalt analysiert werden. Wegen der Forderung der Konstanz des Dialysevolumens ist dieses Vorgehen bei der Mikrausführung unserer Apparatur das Gegebene. Da Gefäße und Membranen unter sich ganz gleich sind, können wesentliche Fehler nicht entstehen.

1. *Die Prüfung auf Eiweißdichtigkeit* der Gefäße und der Membranen geschah mit mehreren Substanzen in verschiedenen Verdünnungen, nämlich erstens mit Menschenserum, dessen Eiweißkörper ein Molekulargewicht von 176 000 bis 70 000 haben. Zweitens wurde das nach der Vorschrift von *Kekwick* kristallisiert dargestellte Pferdealbumin (Molekulargewicht 68 000) verwandt und endlich das ebenfalls rein dargestellte Cytochrom (c) (Molekulargewicht 15 600). Die kjeldahlometrischen Analysen ergaben in keinem Fall, auch bei stärkeren Verdünnungen ein Durchtreten dieser Stoffe durch die Membran.

2. *Die Prüfung der Membran mit niedermolekularen Stoffen* erfolgte mit Hilfe von Harnstoff (Molekulargewicht 60), Harnsäure (Molekulargewicht 168), Traubenzucker (Molekulargewicht 180) und Glykokoll (Molekulargewicht 75). Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 3 zusammengestellt. Da die Konzentration in der Dialyseflüssigkeit gemäß der Formel von *Brintzinger* nach einer e-Funktion abnimmt, ergibt die halblogarithmische Darstellung der Abb. 3 eine gerade Linie. Man erkennt ohne weiteres, daß die einzelnen Meßpunkte in befriedigender Weise auf einer Geraden liegen. Die Dialysekoeffizienten berechnen sich im Durchschnitt:

$$\begin{aligned} \lambda \text{ Harnstoff} &= 2,6 \cdot 10^{-3} \pm 0,4, & \lambda \sqrt{M} &= 2,0 \cdot 10^{-2}, \\ \lambda \text{ Harnsäure} &= 1,2 \cdot 10^{-3}, & \lambda \sqrt{M} &= 1,6 \cdot 10^{-2}, \\ \lambda \text{ Traubenzucker} &= 1,3 \cdot 10^{-3} \pm 0,4, & \lambda \sqrt{M} &= 1,7 \cdot 10^{-2}, \\ \lambda \text{ Glykokoll} &= 2,4 \cdot 10^{-3}, & \lambda \sqrt{M} &= 2,0 \cdot 10^{-2}. \end{aligned}$$

Man erkennt, daß das Wurzelgesetz von *Brintzinger* näherungsweise zutrifft. Für Harnsäure und Traubenzucker liegen die Werte offenbar etwas zu niedrig, was auf eine leichte Behinderung dieser Stoffe beim Durchtritt durch die Poren der Membran hinweist. Daß schon relativ niedermolekulare Körper eine solche Behinderung zeigen, haben, wie

schon erwähnt, *Jander* und *Spandau* und *Spandau* und *Gross* ebenfalls gefunden. Immerhin sind größerenordnungsmäßige Bestimmungen des Molekulargewichtes bis zu einem Wert von etwa 200 mit unserer Apparatur noch möglich. So läßt sich z. B. zeigen, daß der Traubenzucker im Liquor tatsächlich in molekularer Form gelöst ist, da sich bei Dialyse des Liquors mit entsprechenden Zuckerbestimmungen der gleiche

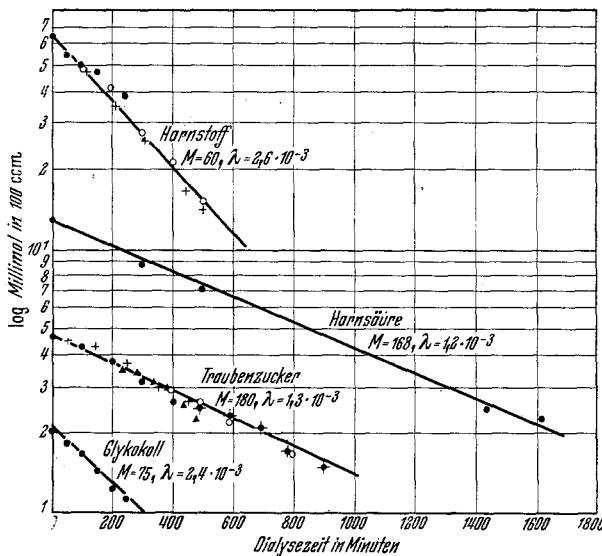


Abb. 3. Dialyse bekannter chemischer Substanzen verschiedenem Molekulargewichts. Halblogarithmische Darstellung. Bei den mit O und + bezeichneten Meßpunkten der Traubenzuckerkurve handelt es sich um die Dialyse dieses Stoffes aus Liquor.

Dialysekoeffizient ergibt wie mit der reinen in Puffer gelösten Substanz (Abb. 3).

3. Das Verhalten der hochmolekularen Körper im Liquor bei der Dialyse muß von Fall zu Fall geprüft werden, je nach den Eigenschaften, die zur Diskussion stehen. Ganz allgemein läßt sich sagen, daß die Dialyse zwar einen schonenden Eingriff darstellt, daß aber bei den hochempfindlichen hochmolekularen Eiweißkörpern leichte Denaturierungsvorgänge, Spaltungen oder Assoziationen der Moleküle infolge des Versuches nicht ausgeschlossen sind. Wir selbst haben uns auf das Verhalten der Wassermann-Reaktion und der Kolloidreaktionen beschränkt. Hierbei ergaben sich einige bemerkenswerte Resultate, die in Tabelle 1 zusammengestellt wurden.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Luesreaktionen (Wa.R. und M.K.R. II) nach der Dialyse im allgemeinen leicht abgeschwächt sind. Bei Nr. 2 verschwand eine mittelstark positive M.K.R. II vollständig nach dem Versuch, der Wassermann war allerdings auch im Nativliquor negativ. Demgegenüber stehen der Liquor Nr. 8 und 6, bei

Tabelle 1. Verhalten der Luesantikörper bei der Dialyse
(24—48 Stunden).

	Diagnose	Vor der Dialyse		Nach der Dialyse	
		Wa.R.	M.K.R. II	Wa.R.	M.K.R. II
1	Lues latens	Ø	Ø	Ø	Ø
2	Progressive Paralyse nach Malariabehandlung	Ø	++	Ø	Ø
3	Tabes dorsalis	0,2 ++ 0,6 +++	+++	0,2 Ø 0,6 ++ 1,0 +++	++
4	Lues latens	Ø	Ø	Ø	Ø
5	Progressive Paralyse	0,2 +++	+++	0,2 +++	+++
6	Lues latens	Ø	Ø	1,0 +	—
7	Lues cerebrospinalis	0,2 Ø 0,2 + 1,0 ++	+++	0,2 Ø 0,6 Ø 1,0 +	++
8	Lues cerebri	Ø	Ø	0,2 Ø 0,6 Ø 1,0 ++	++
9	Progressive Paralyse	0,2 +++	+++	0,2 +++	+++
10	Lues congenita	Ø	Ø	Ø	Ø
11	Lues cerebri	0,2 + 0,6 +++ 1,0 +++	+++	0,2 Ø 0,6 + 1,0 +++	Ø
12	Serum, Lues	Eigen- hemmung	+++	+++	++
13	Serum, Lues	Eigen- hemmung	+++	+++	++
14	Serum, Lues	Eigen- hemmung	Ø	Eigen- hemmung	Ø
15	Serum, Lues	Ø	Ø	0,2 Ø 0,6 ++	Ø

denen völlig negative Luesreaktionen nach der Dialyse „demaskiert“ werden. Es ist möglich, daß in diesem Fall dem Nativliquor irgendwelche Stoffe beigemengt waren, die den positiven Ausfall der Reaktionen verhinderten und die durch die Dialyse entfernt wurden. Das gleiche geschah mit dem Serum Nr. 15. Bei zwei Seren (Nr. 12 und 13) trat etwas ähnliches auf. Nur handelt es sich hier um Substanzen, die Eigenhemmung im Nativserum verursachten. Bei einem weiteren Serum (Nr. 14) gelang es nicht, die Eigenhemmung durch Dialyse zu beheben.

Die *Kolloidkurven* veränderten sich durch die Dialyse praktisch nicht. Allerdings muß gegen eine Pufferlösung von P_H 8,0 dialysiert werden. (Vgl. die IV. Mitteilung dieser Serie.)

4. Das Verhalten der niedermolekularen Stoffe im Liquor bei der Dialyse wurde eingehend untersucht. Es war vor allem festzustellen, wann eine vollständige Trennung der dialysablen von den nichtdialysablen Stoffen eingetreten ist. Ferner interessierte der Verlauf der Konzentrationskurve in Abhängigkeit von der Dialysezeit, da sich hieraus wenigstens größtenteils Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der niedermolekularen Substanzen im Liquor machen lassen. Zur Lösung dieser Fragen wurden drei Methoden angewandt, nämlich die kjeldahlometrische

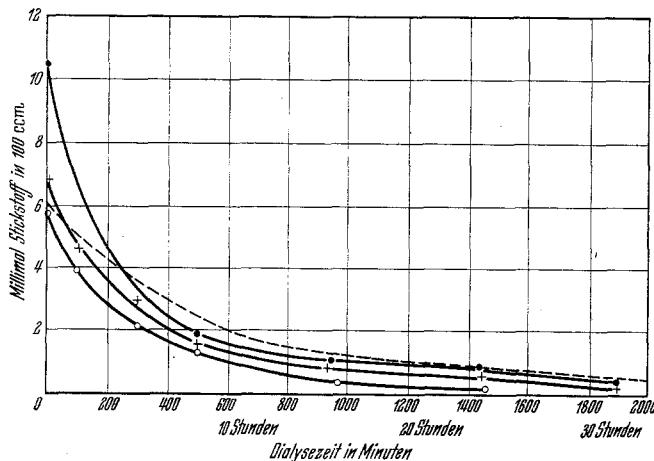


Abb. 4. Dialyse der stickstoffhaltigen Substanzen des normalen Liquors. Die gestrichelte Kurve stellt den theoretischen Verlauf der Dialyse von 2 Millimol. Harnstoff + 4 Millimol. Harnsäure dar.

Stickstoffbestimmung, die Feststellung des Brechungsindex mit Hilfe der Refraktometrie und Interferometrie und die Spektralphotometrie im Ultravioletten.

a) Die kjeldahlometrische Stickstoffbestimmung wurde mit je 2 ccm Flüssigkeit ausgeführt. Die Titrationen erfolgten mit Methylrot als Indicator unter elektrometrischer Kontrolle des p_H am Umschlagpunkt. Auf diese Weise ließen sich sehr gut reproduzierbare Werte gewinnen. Die jodometrische Titration hat sich *nicht* als zweckmäßig erwiesen, da sich bei den in Frage kommenden sehr verdünnten Lösungen der Äquivalenzpunkt nicht genau bestimmen lässt.

Abb. 4 gibt die kurvenmäßige Darstellung der Ergebnisse, und zwar ist das Absinken der Konzentration der niedermolekularen stickstoffhaltigen Substanzen gegen die Dialysezeit aufgetragen. Es wurde bis zur Konstanz der N-Werte dialysiert, was im allgemeinen nach 24 bis 48 Stunden bei normalem Liquor auftrat. Dieser Stickstoffwert entspricht dem Eiweiß-Stickstoff. Er wurde von dem in den Dialysiergefäßen bestimmten Gesamtstickstoff jeweils abgezogen. Man sieht

aus Abb. 4, daß sich nach 15—20 Stunden noch eine beträchtliche Menge niedermolekularer N-haltiger Substanzen in der Dialysierzelle befindet. Erst jenseits der 30-Stundengrenze werden die Werte so niedrig, daß sie praktisch auf die Konzentration Null gesunken sind. *Es ist also eine Dialysezeit von mindestens 24, besser 48 Stunden zur Trennung der hochmolekularen von den niedermolekularen stickstoffhaltigen Substanzen im normalen Liquor erforderlich.* Die im Schrifttum angegebenen Dialysezeiten (z. B. Dialyse „über Nacht“) sind im allgemeinen zu kurz, zumal durchweg unter viel ungünstigeren Bedingungen gearbeitet wurde, vor allem was die Durchmischung der Flüssigkeit anbetrifft. Die gestrichelte Linie der Abb. 4 gibt den theoretischen Verlauf der Dialyse einer Mischung von 2 Millimol. Harnstoff und 4 Millimol. Harnsäure wieder. Die Kurve schmiegt sich anfangs der experimentell gefundenen weniger gut, später aber sehr gut an. Insbesondere ist der Kurvenabfall der experimentell ermittelten Stickstoffkurven anfänglich steiler, was darauf hinweist, daß noch Substanzen im Liquor vorhanden sein müssen, die ein kleineres Molekulargewicht besitzen als Harnstoff (Molekulargewicht 60). Der Vergleich zwischen der theoretischen und den empirischen Kurven zeigt aber weiter deutlich, daß N-haltige Körper von wesentlich höherem Molekulargewicht als Harnsäure unter den niedermolekularen stickstoffhaltigen Stoffen im normalen Liquor jedenfalls nicht in nennenswerten Mengen vorhanden sein können. Es besteht also zwischen der Teilchengröße der niedermolekularen stickstoffhaltigen Körper und der Eiweißkörper ein sehr großer Sprung, zwischen den Werten von etwa 200 (Größenordnung der Harnsäure) und den Werten 70 000 bis 176 000 (Größenordnung der Eiweißkörper).

b) Die Bestimmung des Brechungsindex mit Hilfe der *Refraktometrie* und der *Interferometrie* geschah mit Hilfe des Eintauchrefraktometers von Zeiß bzw. mit dem Wasserinterferometer der gleichen Firma. Es wurde jeweils der Brechungsindexunterschied (Δn) zwischen dem Inhalt des Dialysiergefäßes und dem die Außenflüssigkeit darstellenden Phosphatpuffer (P_H 8,0) festgestellt. Das Interferometer wurde mit einer Harnstofflösung bekannten Gehaltes auf Brechungsindexunterschiede geeicht. Dieses Verfahren ist wesentlich zweckmäßiger als die in der Liquorforschung übliche Angabe von Interferometereinheiten, weil das Gerät tatsächlich den Wert Δn mißt, der auch mit anderen Apparaten, z. B. dem Eintauchrefraktometer, bestimmt werden kann. Eine Übersicht über die gewonnenen Ergebnisse gibt die Tabelle 2. Man sieht auch hier, daß zwischen den Werten der 24-Stunden- und der 48-Stunden-Dialyse immer noch deutliche Unterschiede bestehen können. Erst nach 48 Stunden ist meist praktische Konstanz des Δn erreicht. Die Bestimmung des Brechungsindex im Verlaufe der Dialyse bestätigt also die mit Hilfe der Stickstoffbestimmung gefundenen Resultate bezüglich der Zeitdauer, die zur Trennung der hochmolekularen von den niedermolekularen

Tabelle 2.

Liquor-Nummer	Δn vor der Dialyse	Δn Nach 8 St. Dialyse	Δn Nach 15 St. Dialyse	Δn Nach 24 St. Dialyse	Δn Nach 48 St. Dialyse	Δn Nach 72 St. Dialyse
1	—	0,000081	0,000065	0,000051	0,000051	—
2	—	0,000141	0,000085	0,000054	0,000047	0,000047
3	—	0,000220	0,000146	0,000102	0,000085	—
4	—	0,000253	—	0,000069	0,000067	—
5	—	0,000243	—	0,000060	0,000038	—
6	0,001483	0,000265	—	0,000081	0,000059	—
7	0,001609	0,000386	—	0,000092	0,000070	—
8	0,001512	0,000362	0,000127	—	0,000090	—
9	0,001550	—	0,000103	—	0,000052	—
10	0,001374	—	0,000098	—	0,000074	—
11	0,001512	—	0,000089	—	0,000060	—
12	—	—	—	—	0,000274	0,000255
13	—	—	—	—	0,000062	0,000060
14	—	—	—	—	0,000160	0,000159

Stoffen im normalen Liquor erforderlich ist. Der Wert von Δn nach 48 Stunden Dialyse kann zur Eiweißbestimmung verwandt werden, wobei als spezifisches Inkrement die Zahl 0,00202 dient. Der mit Hilfe dieser Methode gewonnene Eiweißwert stimmt mit dem kjeldahlometrischen Größenordnungsmäßig gut überein, wenn auch der Fehler im Einzelfalle etwa 10—15% beträgt.

c) Zur Bestimmung der Absorptionskurven der Liquores im ultravioletten Spektralbereich wurde eine Meßanordnung verwandt, die von Kortüm und Almasy ausgearbeitet und im Institut von Scheibe¹ weiterentwickelt wurde. Das Wesentliche an der Apparatur ist die Verwendung einer kontinuierlichen Lichtquelle (Wasserstofflampe), die es gestattet, noch schmale Banden oder kleine Maxima festzustellen. Die ganze Anordnung ist eingehend in einer Diplomarbeit von Flad² beschrieben. Gegenüber der von dem einen von uns gemeinsam mit F. Pruckner³ verwandten Apparatur ist die in dieser Arbeit gebrauchte ganz wesentlich verbessert⁴.

Abb. 5 zeigt die Absorptionskurve eines einige Tage im Eisschrank aufbewahrten normalen Liquors vor der Dialyse, nach 15 und nach 48 Stunden-Dialyse. Während im Nativliquor das für die Eiweißkörper charakteristische Maximum (E) bei etwa 2800 Å nur eben angedeutet ist, kommt es im Laufe der Dialyse immer deutlicher heraus. Nach 48 Stunden ist die reine Eiweißabsorption zu sehen. Insbesondere sind

¹ Herrn Prof. Scheibe, Physikalisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München, der uns in liebenswürdigster Weise in seinem Institut arbeiten ließ, sind wir zu größtem Dank verpflichtet.

² Flad, H.: Aufbau einer Anordnung zur Messung der Lichtabsorption im Ultraviolet mit kontinuierlicher Lichtquelle. Diplomarbeit, Technische Hochschule München 1941.

³ Pruckner, F. u. K. F. Scheid: Nervenarzt 9, 273 (1936).

⁴ Siehe auch G. Kortüm: Kolorimetrie und Spektralphotometrie. Berlin 1942.

Stoffe, die im Gebiet von 2400—2900 Å absorbieren, verschwunden. Über die Natur dieser Stoffe sowie über die eines zweiten Buckels im Nativliquor (*H*) bei 2850 Å ist nichts bekannt.

In Abb. 6 ist ebenfalls die Absorption eines unmittelbar nach der Entnahme untersuchten normalen Liquors dargestellt, und zwar wurde hier im Gegensatz zur Abb. 5 die Extinktion logarithmisch aufgetragen.

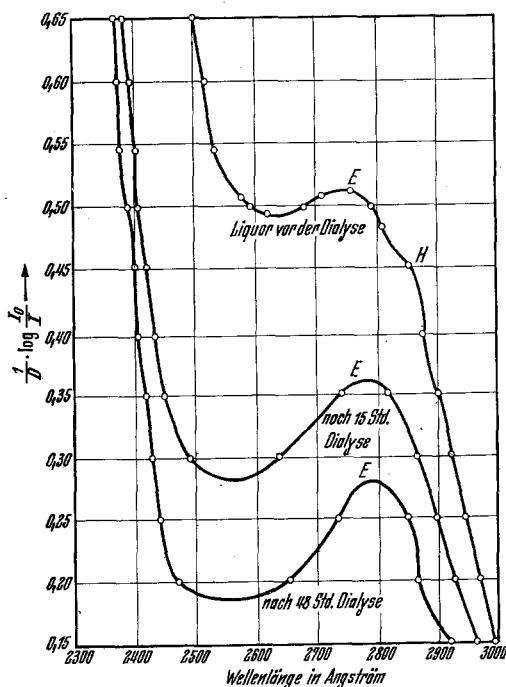


Abb. 5. Absorptionskurve eines normalen Liquors vor der Dialyse, nach 15 und 48 Stunden Dialyse.
E Eiweißmaximum bei 2800 Å.

Der Wert 0 der Ordinate entspricht also der Extinktion 1,0, der Wert 0,3 etwa der Extinktion 2,0. Der Nativliquor zeigt eine ganz wesentlich höhere, über dreifache Absorption als der in Abb. 5 dargestellte. Ein ausgeprägtes Maximum (*Y*) ist bei 2650 Å zusehen, während das Eiweißmaximum des Nativliquors in der hohen GesamtabSORption untergeht. Auch nach 15 Stunden Dialyse verbirgt sich dieses Maximum (*E*) noch in einem breiten Buckel, der offenbar von *E* und *Y* gebildet wird, und erscheint erst deutlich nach 48 Stunden Dialyse. Diese letztere Kurve entspricht wieder der reinen Eiweißabsorption. Die Substanz, die das Maximum *Y* bedingt, ist wiederum nicht bekannt. Sie ist jedoch sehr empfindlich gegen Einwirkungen aller Art.

So verschwindet das Maximum langsam bei einfacher Aufbewahrung des Liquors im Eisschrank im Laufe von einigen Tagen. (Vgl. die wesentlich niedrigere Absorption des aufbewahrten Liquors der Abb. 5.)

Abb. 7 lässt die Absorptionskurve eines ebenfalls mit den üblichen Laboratoriumsmethoden als normal befundenen Liquors einer akuten Schizophrenie erkennen. Das Gebiet von 2400—2600 Å ist von einer deutlich ins Auge fallenden Absorption ausgefüllt, die einen steilen Kurvenverlauf bedingt. Auch bei diesem Liquor lässt sich die reine Eiweißabsorption mit ihrem Maximum bei etwa 2800 Å nach 48stündiger Dialyse darstellen. Nach 8 Stunden ist der Liquor noch nicht vollständig ausdialysiert, es haben sich aber zwei kleine Buckel (*X* und *E*) deutlicher als im Nativliquor herausprofiliert. Der *E*-Buckel entspricht

dem Eiweißmaximum, der andere einer wiederum noch unbekannten Erscheinung.

Die Ausmessung weiterer Spektrogramme von verschiedenen Liquores ergab folgendes:

1. Die reine Eiweißabsorption mit ihrem Maximum bei 2800 Å lässt sich nach ausgiebiger Dialyse immer darstellen. Hierzu ist eine

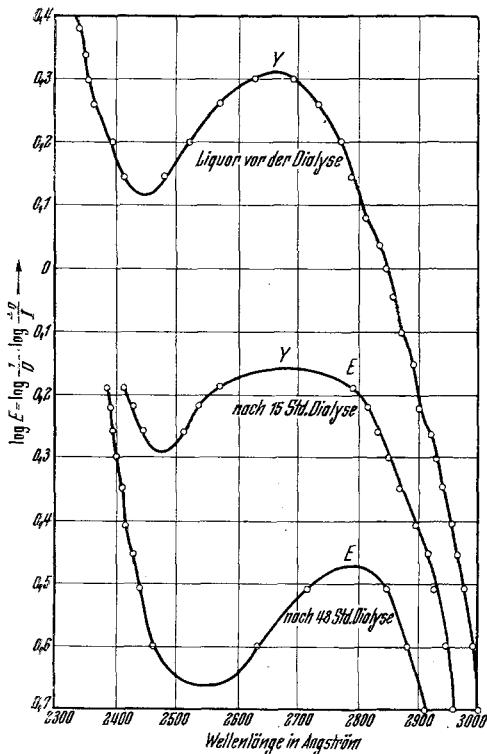


Abb. 6. Absorptionskurve eines normalen Liquors vor der Dialyse, nach 15 und 48 Stunden Dialyse. Extinktion logarithmisch aufgetragen. E Eiweißmaximum bei 2800 Å, Y Maximum einer unbekannten Substanz bei 2650 Å.

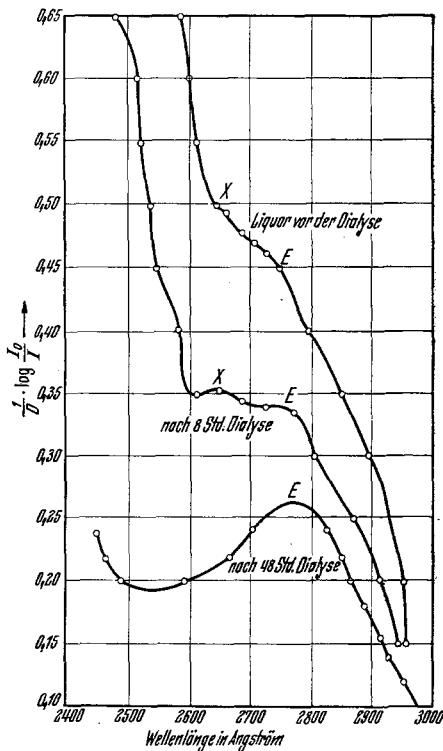


Abb. 7. Absorptionskurve eines Liquors einer akuten Schizophrenie (Febrile Episode). Vor der Dialyse ausgeprägte Steilkurve mit starker Absorption im Gebiet von 2400—2600 Å. Herausprofilierung des Eiweißmaximums E nach 48 Stunden Dialyse.

Zeit von 15—48 Stunden notwendig. In einzelnen Fällen scheint der Liquor auch nach 48 Stunden noch nicht völlig ausdialysiert zu sein (vgl. Tabelle 3). Meistens unterscheiden sich jedoch die Absorptionskurven nach 48 Stunden Dialyse nicht wesentlich von den nach 24 Stunden erhaltenen. Die spektrophotometrische Methode bestätigt also wiederum die mit Hilfe der N-Bestimmung und der Interferometrie gewonnenen Ergebnisse. — Grundsätzlich ist nach erfolgter Trennung der hochmolekularen von den niedermolekularen Stoffen durch Dialyse im Liquor eine

Eiweißbestimmung spektrographisch möglich. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Werte. Man erkennt, daß die Extinktionen ungefähr die Menge des Eiweißes in Dezigrammen angeben, wenn auch erhebliche Abweichungen im Einzelfalle vorkommen.

Tabelle 3.

Ver- such	Eiweiß- gehalt in mg%	Extinktion bei 2800 Å	Bemerkungen
1	22	0,18	
2	35	0,33	
3	29	0,26	
4	26	0,23	
5	36	0,28	sehr hohe Absorption, möglicherweise nicht voll ausdialysiert
6	25	0,38	
7	30	0,32	

schnittliches Molekulargewicht nach der Formel von *Brintzinger* schätzen lassen:

$$\lambda = \frac{1}{0,4343 \cdot t} (\log E_0 - \log E_t).$$

Man hätte also die Extinktionen z. B. bei 2600 Å aus den Kurven abzulesen und von ihnen den Betrag der reinen Eiweißextinktion (48 Stunden Dialyse) abzuziehen und in die obige Formel einzusetzen. Die Zeit t bedeutet die Dialysezeit in Minuten. Dieses Verfahren ist aber im Liquor deswegen nicht brauchbar, weil schon einfaches Aufbewahren der Flüssigkeit bei der Temperatur der Dialyse die Absorption der Cerebrospinalflüssigkeit im Ultraviolett erheblich ändert, wie schon oben erwähnt wurde und wie in einer späteren Mitteilung im einzelnen ausgeführt werden soll. Unter anderen Bedingungen könnte die kurz skizzierte Methode der spektrographischen Molekulargewichtsschätzung unbekannter Stoffe in biologischen Flüssigkeiten aber einmal wichtig werden.

Zusammenfassung.

Es wird eine Mikroapparatur zur Dialyse von biologischen Flüssigkeiten beschrieben und nach quantitativen Gesichtspunkten durchgearbeitet. Mit Hilfe dieser Apparatur gelingt eine vollständige Abtrennung der hoch- und niedermolekularen Substanzen im Liquor cerebrospinalis. Es läßt sich zeigen, daß die niedermolekularen Stoffe kein wesentlich höheres Molekulargewicht als etwa 200 besitzen. Die hochmolekularen Körper, die fast ausschließlich Eiweißkörper sind, lassen sich nach der Dialyse durch Stickstoffbestimmung, durch Interferometrie oder durch Spektralphotometrie mengenmäßig erfassen. Mit Hilfe der

genannten Methoden läßt sich das Herausdialysieren der niedermolekularen Stoffe verfolgen. Die Zeit zur vollständigen Trennung der dialysierbaren Stoffe von den nichtdialysierbaren beträgt etwa 48 Stunden.

Die Apparatur dürfte auch für Probleme der Physiologie, der Bakteriologie und der Virusforschung brauchbar sein.

Literaturverzeichnis.

Jander, G. u. H. Spandau: Z. physik. Chem. A **185**, 325 (1939). — *Kuhn, A.: Kolloidchemisches Taschenbuch.* Leipzig 1935. — *Manegold, E. u. K. Kalauch: Kolloid-Z.* **86**, 186 (1939). — *Meyer, K. H.: Die hochpolymeren Verbindungen.* Leipzig 1940. — *Spandau, H. u. W. Gross: Ber. dtsch. chem. Ges.* **74**, 362 (1941).