

Zur Kenntnis der Netzhautstoffe III¹

Über den Vitamin-C-Gehalt der Netzhaut

Von O. BRUNNER und W. KLEINAU

Aus dem I. Chemischen Universitätslaboratorium in Wien

(Eingelangt am 9. 6. 1936, Vorgelegt in der Sitzung am 18. 6. 1936)

Über den Vitamin-C-Gehalt der Augenlinsen und des Kammerwassers liegen entsprechend der Bedeutung dieses Vitamins für Oxydations-Reduktionsvorgänge eine ganze Reihe von Arbeiten vor. Die verschiedenen Autoren² stellten hiebei teils auf biologischem Wege, teils durch chemische Methoden im normalen Auge einen relativ hohen Gehalt an Vitamin C fest; er wird z. B. für die Rinderlinse mit 0,4 mg, für 1 cm³ Kammerwasser (Rind) mit 0,21 mg angegeben.

Über das Vorkommen von Vitamin C in der Netzhaut ist jedoch unseres Wissens bisher noch recht wenig bekannt. Ein Hinweis auf ein solches findet sich nur in einer Fußnote einer Arbeit von H. v. EULER und H. HELLSTRÖM³ sowie in einer Arbeit von G. BIETTI und A. CARTENI⁴, welche letztere Abhandlung uns aber leider nicht im Original zugänglich war.

Wir haben uns mit Rücksicht auf unsere Problemstellung für den Vitamin-C-Gehalt der Netzhaut interessiert und diesen an den Augen von Rindern, Schweinen und Schafen bestimmt.

¹ 1. Mitteilung: BRUNNER, BARONI und KLEINAU, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **236** (1935) 257; 2. Mitteilung: BRUNNER u. KLEINAU, Mh. f. Chem. **68** (1936) 244, bzw. S.-B. Akad. Wiss. Wien II b **5** (1936) 464.

² KOTAKE u. NISHIGAKI, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **219** (1933) 224; EULER u. Mitarb., Hoppe-Seylers Z. physiol.-Chem. **222** (1934) 65, **230** (1935) 225, Arch. f. Augenheilk. **109** (1935) 225 u. a.; MÜLLER, BORSCHKE, GURWITSCH, BRÜHL, Klin. Wschr. **13** (1934) 20; v. EEKELEN, EMMERIE, JOSEPHY, WOLF, Klin. Wschr. **13** (1934) 564; FISCHER, Klin. Wschr. **13** (1934) 596; TATIMATSU, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **225** (1934) 275; BIRCH u. DANN, Biochem. J. **28** (1934) 638; BIRCH u. DANN, Nature **134**, 383; GOLDMANN u. BUSCHKE, Klin. Wschr. **14** (1935) 239; RAY, GYÖRGY, HARRIS, Biochem. J. **29** (1935) 735; BIETTI u. CARTENI, Boll. soc. Ital. biol. sperim. **9**, 283 (C. 1935, II, 3124); MÜLLER, Klin. Wschr. **14** (1935) 1509; DEMOLE u. MÜLLER, Biochem. Z. **281** (1935) 80; UTSIMI, SEI-I-KWAI, Med. J. **54**, Nr. 11 (C. 1936, I, 1651); LUDANY, Biochem. Z. **284** (1936) 108.

³ EULER u. HELLSTRÖM, Svensk Kemisk Tidskrift **45** (1933) 205.

⁴ loc. cit.

Was die Bestimmung des Vitamins C betrifft, so haben EULER und KLUSMANN⁵ gezeigt, daß das TILLMANSsche Reagens (2, 6-Dichlorphenolindophenol) nicht unbedingt spezifisch ist für Ascorbinsäure (Vitamin C), sondern daß auch Glutathion sowie physiologische Sulfhydrylverbindungen des Tierkörpers — unter diesen ist besonders Cystein hervorzuheben — Reduktionswirkung zeigen und den Farbstoff entfärben. TILLMANS konnte bereits auf qualitative Unterschiede im Verhalten der SH-Verbindungen und der Ascorbinsäure gegenüber dem nach ihm benannten Reagens hinweisen und das „Ziehen“ der Sulfhydrylverbindungen bei der Titration beobachten. Auch HARRIS und RAY⁶ beschäftigten sich mit der Frage der Unterscheidung von Ascorbinsäure und SH-Stoffen auf reduktionstitrimetrischem Wege. MARTIUS und EULER⁷ untersuchten schließlich ausführlich, in welchem p_H -Bereich die Reduktion des TILLMANSschen Reagens stattfindet und ob und in welchem Grade sich Ascorbinsäure, Glutathion und SH-Substanzen gegenseitig beeinflussen. Zu diesem Zwecke stellten sie die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber 2, 6-Dichlorphenol-indophenol für Ascorbinsäure, Glutathion und Cystein fest und nahmen auch entsprechende Untersuchungen an Gemischen dieser Substanzen vor. Sie konnten hiebei zeigen, daß die Komponentenpaare dieser Stoffe sich gegenseitig hinsichtlich der Reduktion des Farbstoffes fast nicht beeinflussen, und es ergab sich in analytischer Hinsicht die wertvolle Tatsache, daß in stark saurer Lösung nur die Ascorbinsäure allein durch die Titration erfaßt wird, wobei sich als Optimum eine Wasserstoffionenkonzentration von $p_H=2.5$ erwies. Diese Acidität muß bei den Bestimmungen genau eingehalten werden und darf um nicht mehr als einige Zehnteileinheiten überschritten werden.

Wir haben daher unsere Messungen durch Titration mit 2, 6-Dichlorphenolindophenol bei einem $p_H=2.5$ vorgenommen. Wir gingen hiebei so vor, daß wir die frischen Augen sofort nach dem Einlangen aus dem Schlachthause durch einen Frontalschnitt knapp hinter der Ora serrata eröffneten und die Netzhäute herauspräparierten. Sie wurden zur vollständigen Entfernung des Glaskörpers rasch zentrifugiert, sodann mit einer gemessenen Menge Pufferlösung ($p_H=2.5$) versetzt und unter Zusatz von Seesand möglichst rasch zerrieben. Selbstverständlich wurden

⁵ EULER u. KLUSMANN, Svensk Kemisk Tidskrift **44** (1932) 292.

⁶ HARRIS u. RAY, Biochem. J. **27** (1933) 303.

⁷ MARTIUS u. EULER, Biochem. Z. **271** (1934) 9.

diese Prozeduren so vorgenommen, daß eine Oxydation durch Luftsauerstoff möglichst vermieden wurde. Nach vollständiger Extraktion wurde neuerlich zentrifugiert, die erhaltenen Extraktlösungen in eine Mikrobürette gefüllt und eine gemessene Menge der Farbstofflösung austitriert. Die Versuche wurden mehrmals wiederholt, wobei auch jeweils verschiedene Mengen von Netzhäuten verwendet wurden. Die Übereinstimmung war — wenn man die nicht genau reproduzierbare Größe der Netzhäute in Betracht zieht — eine recht gute; die Abweichungen von den Mittelwerten betragen höchstens $\pm 10\%$.

Die so gefundenen Werte betragen beim

Rind . . .	0'105 mg	Ascorbinsäure	pro	Netzhaut
Schwein . . .	0'026	„	„	„
Schaf . . .	0'040	„	„	„

Die Endpunkte der Titrationsen waren äußerst scharf und deutlich; auch bei Titrationsversuchen in neutraler Lösung waren die Umschläge scharf und kein „Ziehen“ zu bemerken. In Übereinstimmung damit fiel auch die Reaktion mit Nitroprussidnatrium negativ aus; SH-Verbindungen scheinen also in der Netzhaut nicht anwesend zu sein.

Die vorliegende Arbeit wurde seitens der Akademie der Wissenschaften in Wien durch eine Subvention aus den Mitteln der Zachstiftung gefördert. Wir gestatten uns auch an dieser Stelle unseren Dank hierfür auszusprechen.