

(Staatliche Landesstelle für öffentliche Gesundheitspflege, Dresden).

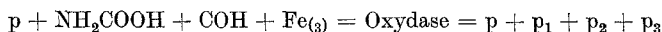
Quantitative Bestimmung von Partialoxonen.

Von

Dr. W. Loele.

(Eingegangen am 23. Juli 1931.)

Fügt man zu pflanzlichen Auszügen (Rettich, Spargel, Kartoffel), die Naphtholperoxydasen, aber nicht — Oxydasen — enthalten, Amidosäure, Formaldehyd und Eisenchlorid in Mengen, die mit alkalischen Naphthollösungen keinen Farbstoff bilden, so tritt eine kräftige Oxydase-reaktion in Form einer dunkelvioletten Färbung ein. Der Pflanzenauszug enthält somit einen Teil der Naphthol-Oxydase. Bezeichnet man diesen Teil als p , so gilt die Gleichung:



Es kann dann p sein gleich p_1 oder p_2 oder p_3 oder einer Mischung dieser Faktoren, vielleicht auch ein Stoff, der nichts mit den andern drei Faktoren zu tun hat. Da p_1 p_2 p_3 bekannt sind, läßt sich ihr Einfluß auf das oxydative System mengenmäßig bestimmen.

Nachweis des Einflusses von Aminosäuren auf das System (Versuch 1).

Es wurden folgende Mengen angesetzt.

a-Naphthol (0,5 g in 100,0 1%iger Kalilauge durch Kochen gelöst).	. . . 0,75 cem
	0,5 cem
	0,1 cem
	0,01 cem
Glykokollösung 1 : 100—1 : 2000	0,5 cem
Formollösung (2%)	0,5 cem
Eisenchloridlösung 1 : 100, frisch bereitet	0,1 cem

Es konnte nachgewiesen werden die Aminoessigsäure durch die Naphtholfarbreaktion
bei 0,75 Naphthol : nicht,
0,5 Naphthol bis 1 : 150
0,1 Naphthol bis 1 : 1500
0,01 Naphthol nicht, da auch ohne Glykokoll eine
(rote) Farbreaktion eintrat.

Es kann der Nachweis von Amidosäuren durch das oxydative System nicht durch weitere Verdünnung der Naphthollösung verschärft werden, weil dann das Eisen, nicht mehr ausgeflockt, katalytisch wirksam bleibt.

Einfluß der Aldehydkonzentration.

Vergleiche zeigten, daß man den Aldehyd um so stärker verdünnen kann, je konzentrierter das Glykokoll genommen wird. Das zum Nachweis von Formol in Milch früher aufgestellte System gab auch mit wäßrigen Aldehydlösungen die gleichen Ergebnisse

Naphthollösung	0,75 cem
Gesättigte Glykokollösung	1,00 cem
Aldehydlösung	0,5 cem (fallende Verdünnungen)
Eisenchlorid 1 : 100	0,3 cem

In diesem System gab Aldehyd in einem Verhältnis von 1 : 32000 noch eine Farbreaktion.

Einfluß der Konzentration der Eisenlösung.

Meist erscheint die Farbreaktion um so kräftiger, je größer die Eisenmenge ist. Das gilt aber nicht, wenn die Aldehydmenge sinkt, im Gegenteil wurde die Reaktion deutlicher mit geringeren Eisenmengen und auch da positiv, wo größere Eisenmengen keine Reaktion gaben. Aber diese Verdünnung der Eisenlösung hat ebenfalls eine Grenze, weil bei stärkerem Glykokollgehalt geringe Menge Eisen auch ohne Aldehydzusatz die zur Oxydation notwendige Dispersität erhalten.

Untersucht man nun, welcher Faktor im Rettichsaft wirksam ist, so kommt der Gehalt an Aminosäure in Betracht, da man im System an Stelle von Glykokoll den Rettichextrakt nehmen kann ($p=p_1$).

Da der Extrakt mit 0,5 cem Naphthollösung angesetzt eine rot-violette mit 0,1 Naphthollösung eine schwärzliche Farbreaktion gibt, entspricht er in seiner Wirkung einer Glykokollösung von etwa 1:150.

Nimmt man in dem Versuch 1 an Stelle des Glykokoll verschiedene Aminosäuren, so erhält man für p_1 andere Werte, so ist Leucin in seiner Wirkung nur ein Drittel so stark wie Glykokoll. (Einfluß des molekularen Baues auf die Wirkung der NH_2 -Gruppe). In verschiedenen Pflanzenauszügen schwankt der Wert für p , in einem Spargelextrakt mußte die doppelte Menge des Glykokoll-Formolgemisches zugesetzt werden, um die gleiche Farbreaktion zu erzielen wie mit dem Rettichsaft.

Dagegen war in einem Eiter, der ebenfalls nur Naphthol-Peroxydase-Reaktion gab, p 3mal so groß wie im Rettichsaft. In dem System

Eiter	0,5
Naphthollösung 0,5% in 1% Kalilauge .	0,5
Aldehyd-Glykokoll	
Eisenchloridlösung 1 : 100	0,1

gab bei unverdünnten Eiter Zusatz von 0,03 des Aldehyd-Glykokollgemisches eine starke fast schwarze Reaktion; auch Formolzusatz (0,1) ohne Glykokoll gab eine langsamer eintretende Reaktion. Verschiedene Eiter verhalten sich verschieden.

In Formolgefrierschnitten erhält man auch ohne Eisen und Aminosäure positive Naphtholoxydasereaktion der Eiterzellen. Das Eisen der Zelle wird demnach im abgesonderten Eiter irgendwie beeinflußt.

Die Vermutung, daß der Gehalt an Aminosäure die Naphtholoxydasereaktion ermöglicht, wird durch folgende Reaktionen weiter bestätigt.

Verdünt man den Rettichsaft in einem Verhältnis von 1 Teil Saft zu 10 Teilen Wasser und setzt das oxydative System mit 0,1 Naphthol an, so zeigt der 10fach verdünnte Extrakt noch eine Farbreaktion, verhält sich also wie der Glykokolleextrakt in der Verdünnung von 1 : 1500.

Gibt man zu 5,0 ccm des unverdünnten Rettichsaftes 1,6 ccm der 2⁰/₀igen Glykokollösung und setzt nunmehr das System mit 0,5 Naphthol an, so entspricht die Farbreaktion etwa der einer 1⁰/₀igen Glykokollösung.

Endlich hemmt der Zusatz von 0,5 ccm Rettichsaft die Pepsinsalzsäureverdauung in derselben Weise wie eine zum dritten Teil verdünnte 2⁰/₀ige Glykokollösung.

Die Größe *p* ist nicht immer gleich einer Aminosäure zu setzen, sie ist zunächst nur ein Dispersitätsfaktor. Das geht auch aus der Untersuchung von Harnen hervor. Es wurden 30 Harne in drei verschiedenen Systemen untersucht

Naphthol	0,5 ccm
Harn	0,5 ccm
I. Formol (2 ⁰ / ₀)	0,1 ccm
Eisenchlorid 1 ⁰ / ₀	0,1 ccm
II. Formol-Glykokollgemisch	0,1 ccm
Eisen	0,1 ccm
außerdem Harn 1 : 2, 1 : 3, 1 : 5 verdünnt.	
III. Naphthol 0,1, Formol 0,5, Harn 0,5, Eisen 0,1.	

Reaktion I war 17 mal + Reaktion II 1 : 1 28 mal +, 1 : 2 4 mal, 1 : 3 2 mal, 1 : 5 1 mal +, Reaktion III war auffälligerweise grade dann +, wenn die anderen Reaktionen negativ ausfielen.

Saure Harne sind zu neutralisieren.

Normaler Harn enthält somit einen Faktor der Naphtholoxydase, der, da Blut in diesem System fast keine Reaktion gibt, wahrscheinlich aus der Niere stammt. Nimmt man in Versuch II statt Harn Traubenzucker-, Milchzucker-, Mannitlösung (10⁰/₀ Lösung) und unverdünntes Glycerin, so gibt Traubenzucker eine braunrote, Milchzucker eine schwächere braune, Mannit eine gelbliche, Glycerin keine Färbung, Harnstoff und Harnsäure hatten keinen Einfluß.

Nimmt man an Stelle des α -Naphthol β -Naphtholnatrium (Microcidin *Merck*), 1/2⁰/₀), das von *W. H. Schultze* in die mikroskopische Technik eingeführt wurde, so erhält man mit dem System: Glykokoll, Aldehyd, Eisen ebenfalls eine violette Farbreaktion. Man könnte schließen, daß die eosinophilen Leukocytengranula ebenfalls mit Microcidin eine violette Reaktion geben. Das ist nicht der Fall, sondern sie nehmen nur einen gelblichen Ton an.

Dieses Verhalten wird verständlich, wenn man verschiedene Aminosäuren auf β -Naphthol einwirken läßt.

Formol 2% 0,5, Eisen 0,1	α -Naphthol		β -Naphthol	
Aminosäure 1% 0,5	0,5	0,1	0,5	0,1
Leucin	gelb (Eisenoxyd) blauviolett	dunkelblau- violett bräunlich	grauviolett	blaßviolett- gelblich
Tyrosin			rotviolett	grün
Alanin	lila	lila	rotviolett	blaugrün
Asparaginsäure	lila	rosa	farblos (später blau. Schimmer)	farblos
Hippursäure	gelb	grau	grau	farblos
Glykokoll	violet	blauviolett	violett	grün

Tatsächlich gibt Leucin da mit α -Naphthol eine starke Reaktion, wo es mit β -Naphthol nur schwach reagiert. Da die Granula Leucin enthalten (*A. Neumann*), widerspricht die Gewebsreaktion nicht der künstlichen Reaktion.

Während nun die Naphtholoxidasereaktion als Eisenreaktion abgesehen von den beschriebenen Ausnahmen nur in Verbindung des Eisens mit Aminosäuren und Aldehyd eintritt, ist die Rolle der Aminosäuren und des Aldehydes bei den anderen Oxonen nicht so leicht nachzuweisen.

Eisen allein gibt die Paraphenylendiamin-Oxydase: Peroxydase-Benzidinperoxydase, Naphtholperoxydase- und Indophenolreaktion. Es könnten demnach die Zellreaktionen lediglich Eisenreaktionen ohne Mitwirkung anderer Faktoren sein. Um die Bedeutung der beiden anderen Faktoren festzustellen, wurde das System

Aldehyd	(2%)	(5,0)
Glykokoll	(2%)	(5,0)
Essigsäure	(3%)	(2,5)
Eisenchlorid	(1 : 1000)	(1,0)

aufgestellt mit den einzelnen und den gesamten Faktoren. Fehlende Faktoren werden durch Wasser ersetzt. Das Gemisch wurde unbehandelt, bei 55% inaktiviert und gekocht mit gleichen Teilen der verschiedenen Oxonreagenzien vermengt.

Essigsäure wurde zugesetzt, weil für das Zustandekommen der Indophenolreaktion teils das Vorhandensein von Eisen, teils von sauren Verbindungen im Schrifttum angegeben ist. Aldehyd allein oxydiert eine Phenylendiaminlösung noch in einer Verdünnung von etwa 1 : 1000, mit H_2O_2 bis 1 : 1000 000. Bei stärkerer Verdünnung des Aldehydes 1 : 30—10000 tritt erst Braunfärbung, dann Entfärbung und nun schnelle Braunfärbung, von der Oberfläche aus beginnend, ein. In gewissen Mengenverhältnissen bei Gegenwart von Eisen wird der reduzierte braune Farbstoff nicht wieder gebildet.

Aminosäuren beschleunigen die Oxydation des Phenylendiamin nur wenig, Säuren z. B. Essigsäure oder saure Lipoidé, z. B. Lecithin stärker, besonders bei Gegenwart von H_2O_2 .

	Eisen ohne Säure				Eisen mit Säure			
	Wasser	Alde- hyd	Amino- säure	Alde- hyd Amino- säure	Wasser	Alde- hyd	Amino- säure	Alde- hyd Amino- säure
<i>Paraphenylendiamin-Peroxydase</i>								
I. Paraphenylendiamin- lösung 10,0+0,1 H ₂ O ₂ (3 ⁰ /o)								
1 unbehandelt . .	±	±	+	+	+	+	+	+
2 inaktiviert 55 ⁰	—	+	—	+	+	+	—	—
3 gekocht	—	+	—	+	—	—	—	—
<i>α-Naphthol-Oxydase</i>								
II. α-Naphtholalkalische Lösung								
4 unbehandelt . .	—	—	—	±	—	—	—	+
5 inaktiviert 55 ⁰	—	—	—	—	—	—	—	—
6 gekocht	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>α-Naphthol-Peroxydase</i>								
III. α-Naphthol + H ₂ O ₂ (i. 0,85% Kochsalz- lösung)								
7 unbehandelt . .	+	+	—	—	+	+	+	+
8 inaktiviert . .	—	—	—	—	+	+	—	—
9 gekocht	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>labile Indophenol-Oxydase</i>								
IV. α-Naphthol + Dime- thylphenylendiamin 0,5 : 200 ää (ohne Alkali)								
10 unbehandelt . .	+	+	+	+	+	+	+	+
11 inaktiviert . .	+	±	±	±	+	±	—	—
12 gekocht	+	+	+	+	—	—	—	—
alle Reaktionen trübe, schwach graublau				positive Reaktion, leuchtendes Blau				
<i>Benzidin-Peroxydase</i>								
V. Benzidin + H ₂ O ₂								
13 unbehandelt . .	±	±	±	±	+	+	+	+
14 inaktiviert . .	±	±	—	±	±	±	—	+
15 gekocht	+	+	—	±	+	+	—	+
rötliche, bläuliche, gelbliche grünliche Farbtöne								

Aus diesen Versuchen geht hervor:

1. Eine verdünnte Lösung von Eisenchlorid verliert ihre oxydierende Wirkung gegenüber Paraphenylendiamin schon bei längerem Stehen an der Luft und schneller bei 55°.

2. Zusatz von Säure macht die Eisenlösung luft- und wärmebeständig und aktiviert die Naphthol-Peroxydase.

3. Zusatz von Aminosäuren hebt die Säurewirkung auf.

4. Zusatz von Aldehyd macht unter Umständen kochbeständig.

5. Bei der Oxydation von Benzidinlösung durch die verschiedenen Systeme entstehen verschiedene Farbstoffe.

Vielleicht lassen sich hierdurch einige bakterielle Befunde erklären. Die Paraphenylendiaminoxydase einiger Bakterien wird bei 55° zerstört. Ihre Oxydase verhält sich demnach wie eine verdünnte Eisenlösung oder wie das System Eisen-Säure-Aminosäure.

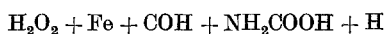
Da Aldehyd ein Gegenfaktor von Aminosäure ist, war zu erwarten, daß Aldehydzusatz die Oxydase gegen Erwärmung schützte. Hierfür spricht der folgende Versuch.

Schwemmt man *Vibrio Metschnikoff* ab mit einer Aldehydlösung (1 : 2000) und inaktiviert, so bleibt die Paraphenylendiaminoxydase, wenn auch abgeschwächt, erhalten. Bei verschiedenen sporenhaltigen Keimen ist die Peroxydase wärmebeständig. (Aldehyd?). Die Wirkung der Aldehydgruppe kann wie der folgende Versuch zeigt auch ein hemmender sein. *Sarcina lutea* bildet in den ersten Tagen der Kultur keine P-Oxone aber bei 55 Grad werden durch einen autolytischen Vorgang Oxone abgespalten. Diese Abspaltung unterblieb, wenn die Kultur mit der 1/2%igen Aldehydlösung abgeschwemmt war.

Hefen, der Benzidinperoxydasereaktion unterworfen, zeigen die verschiedensten Farben an ihren Granula.

Die sichelförmigen Gonidien von *Fusarium aquaeductuum* geben eine schnell eintretende sehr starke P-Peroxydasereaktion, die braune Farbe wird bald reduziert. Die Keime verhalten sich, als ob Aldehyd und Eisen zugegen wäre.

An dem Ausfall der Paraphenylendiamin-Peroxydasenreaktion und entsprechender Reaktion können somit 5 Faktoren beteiligt sein:



Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Anwesenheit von Phenolen. So kann die P-Reaktion in einem inaktivierten System wieder positiv ausfallen bei Gegenwart z. B. von Brenzcatechin.

Da alle Faktoren in Zellen vorkommen können, sind sie wenn sie vorhanden sind, auch an den oxydativen Systemen beteiligt.

Die Vielheit der Faktoren und die Empfindlichkeit des Faktorengemisches machen es verständlich, daß man nur selten völlig einheitliche Ergebnisse erhält, wenn man die Versuche zu verschiedenen Zeiten mit verschiedenen Lösungen ansetzt.

Da einige Oxone nachweisbar an der Entstehung von Strukturen (Granula und mitochondrienähnliche Bildungen) beteiligt sind und da ihre Faktoren nachweisbar in lytische Vorgänge eingreifen, hängt die Strukturbildung ab neben anderen von folgenden Faktoren:

1. Von der H-Konzentration;
2. von dem Gehalt an Aminosäuren;
3. an Aldehyden;
4. an Eisen usw.;
5. an Phenolen bzw. Chromogenen.

Es paßt zu dieser Anschauung, wenn als Ursache für die perniziöse Anämie von den amerikanischen Forschern *Dakin*, *West* und *Herve* der Mangel von zwei Oxyaminosäuren bei der Blutkörperchensynthese angesehen wird. Entwicklungs- und stammesgeschichtlich sind bei der Bildung der roten Blutkörperchen alle Faktoren der oxydativen Systeme zeitweise vorhanden, somit greifen auch Aminosäuren irgendwie in den Vorgang der Bildung roter Blutkörperchen ein.

Von den Verdauungsfermenten sind es die amylolytischen, die nicht selten mit α -Naphtholoxidasen zusammen auftreten. Ein amylolytisches System, das Kleister zur Aufhellung durch Auflösung der Stärkekörner bringt, ist Eisenchlorid und H_2O_2 . Hierbei tritt Formaldehyd auf. Das System wird durch Zusatz von Aminosäuren, von Essigsäure, stärker durch Aldehyd gehemmt, demnach durch Faktoren, die auch an der Naphtholoxidasereaktion beteiligt sind.
