

Eine Mikromethode zur Bestimmung der Cerebroside.

Von **Paul Kimmelstiel**.

(Aus der Chem. Abt. d. Physiolog. Instituts in Breslau, Vorst. Prof. E. SCHMITZ.)

(Eingelangt am 2. Mai 1929.)

Ogleich wir über die chemische Konstitution der Cerebroside gut unterrichtet sind, wissen wir fast nichts über die Art und Weise, wie sich diese Körper an den Stoffwechselfvorgängen beteiligen. Dabei ist jedoch schon von vornherein anzunehmen, daß die Rolle, die sie spielen, keine unwesentliche sein kann; denn sie sind schon ihrer Masse nach mit 9% (nach THIERFELDER 13%) der Trockensubstanz am Aufbau des Gehirns beteiligt. Auch in einigen anderen Organen sind sie nachgewiesen worden. Von der Pathologie her wissen wir sogar, daß sehr bedeutsame Änderungen des Cerebrosidegehaltes der Organe auftreten können, so z. B. bei der Splenomegalie Gaucher, bei der ungeheuer große Mengen Galaktosids in der Milz gespeichert werden¹⁾ können. Ferner weiß man durch die Untersuchungen NOLL's²⁾, daß bei der Degeneration der peripherischen Nerven die Cerebroside in großem Maßstabe abgebaut werden. Dann hat man auch bei der Untersuchung der Lipoide in atherosklerotischen Aorten (SCHÖNHEIMER)³⁾ Cerebroside gefunden, und es ist durchaus wahrscheinlich, daß man bei entsprechend darauf gerichteter Aufmerksamkeit auch bei anderen Erkrankungen, die mit verändertem Lipoidgehalt des Blutes und der Organe einhergehen, eine Beteiligung der Cerebroside wird feststellen können.

Allerdings fehlt es bisher an geeigneter Methodik, die Cerebroside in kleinen Mengen quantitativ zu erfassen. Alle bisherigen Untersuchungen (mit Ausnahme der Arbeiten von NOLL und WINTERSTEIN) beruhen auf der präparativen Darstellung, die natürlich nur unter Anwendung entsprechend großer Mengen durchführbar sind. Das Verfahren von NOLL besteht in der Bestimmung der durch vorsichtige Hydrolyse aus dem Cerebrosid

¹⁾ EPSTEIN, E., Biochem. Zeitschr. 145, 398 (1924); LIEB, H., Zeitschr. für physiol. Chemie 140, 305 (1925).

²⁾ NOLL, A., ebda. 27, 370 (1899).

³⁾ SCHÖNHEIMER, R., ebda. 177, 143 (1928).

freigemachten Galaktose mit Hilfe der BERTRAND'schen Reduktionsmethode. Das Verfahren ist jedoch umständlich, dauert sehr lange und es haften ihm — wie ich später zeigen werde — gewisse grundsätzliche Mängel an. Auf dem gleichen Prinzip ist auch die Methode von WINTERSTEIN und HIRSCHBERG⁴⁾ aufgebaut, nur ist hier die Zeitdauer der Bestimmung wesentlich verkürzt, und durch die Anwendung der GREINER'schen Modifikation der BERTRAND'schen Methode kommt man mit wesentlich kleineren Mengen der Ausgangssubstanz aus. Inwieweit jedoch bei diesem relativ einfachen Verfahren Fehler unterlaufen können, insbesondere durch Mitbestimmung anderer reduzierender Substanzen, ist nicht abzuschätzen. Deshalb besteht auch heute noch der Satz THIERFELDER's zu Recht: „Ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung (der Cerebroside), von dem festgestellt ist, daß es zuverlässige Resultate gibt, kennt man zurzeit nicht.“ Diese Lücke auszufüllen, bin ich bestrebt gewesen.

Das hier anzugebende Verfahren, dessen Brauchbarkeit an rein dargestellten Cerebrosiden nachgeprüft wurde, bringt grundsätzlich nichts Neues. Es basiert auf den gleichen Voraussetzungen wie die NOLL'sche Methodik: hydrolytische Abspaltung des Zuckers und Bestimmung desselben. Es ist lediglich versucht worden, durch Anwendung der Zuckerbestimmung nach HAGEDORN-JENSEN die bestimmbare Galaktosemenge noch weiter zu verringern und, soweit es möglich ist, die oben angegebenen Fehler zu beseitigen. Die Bestimmung ist möglichst vereinfacht, um Reihenuntersuchungen vornehmen zu können. Mit ihrer Hilfe wird es vielleicht möglich sein, etwas Näheres über die Beteiligung der Cerebroside am Stoffwechsel etwa auf experimentellem Wege zu erfahren.

Im folgenden nehme ich eine kurze Zusammenstellung der einzelnen Phasen der Bestimmung vorweg, die ich danach im einzelnen kritisch auswerten möchte.

1. Extraktion in heißem Alkohol.
2. Hydrolyse des eingedampften Extraktes mit Salzsäure.
3. Neutralisation der salzsauren, galaktosehaltigen Lösung.
4. Bestimmung der reduzierenden Substanz nach HAGEDORN-JENSEN (Hydrolysebestimmung).
5. Bestimmung der reduzierenden Substanzen, die vor der

⁴⁾ WINTERSTEIN, H., und HIRSCHBERG, Biochem. Zeitschr. 159, 351 (1925).

Hydrolyse im alkoholischen Extrakt vorhanden sind (Anfangsbestimmung).

Der Wert für den Cerebrosidzucker ergibt sich als Differenz zwischen Hydrolysebestimmung (4) minus Anfangsbestimmung (5), und wird mit 4,6 (THIERFELDER) multipliziert, um den Cerebrosidwert zu erhalten.

A d 1: Das lebendfrische Gehirnmaterial (die folgenden Zahlen beziehen sich auf etwa 250 mg Frischgewicht) wird in flüssiger Luft zu einem feinen Pulver zerrieben und noch im gefrorenen Zustand in einem mit Alkohol gefüllten Kölbchen abgewogen. In mehrfach zu wechselndem, siedendem 96% igem Alkohol wird bis zur Erschöpfung extrahiert. Die alkoholische Lösung wird — noch heiß — quantitativ mit heißem Alkohol in ein 25-cm-Kölbchen überführt und nach dem Erkalten auf Zimmertemperatur zur Marke aufgefüllt. Dabei fällt ein feiner, weißlicher Niederschlag (substance blanche) aus, der längere Zeit in der Schwebe bleibt. Das etwas umständliche Aufnehmen des lebendfrischen Materials in flüssige Luft hat sich auf Grund von Versuchen, die ich gemeinsam mit Herrn Dr. JUNGMANN (vom physiologischen Institut in Breslau, Prof. WINTERSTEIN) machte, als notwendig erwiesen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß sich die Galaktoside beim Stehenlassen des Gehirnmaterials an der Luft unerwartet rasch zersetzen. Für alle Einzelheiten muß ich auf die in aller Kürze erscheinende Arbeit verweisen.

A d 2: Die Lipoidlösung wird gut umgeschüttelt und 3 cm werden in ein „Hydrolysekölbchen“ pipettiert. Als solches wird ein kleiner Rundkolben von 50 cm Inhalt aus Jenaer Glas benutzt, in dessen langem Hals ein Glasstöpsel eingeschliffen ist, der durch eine Metallklammer festgehalten werden kann. Bei gleichzeitiger Ausführung mehrerer Bestimmungen werden die Hydrolysekölbchen in ein hierfür angefertigtes Metallgestell senkrecht eingesetzt, in ein Wasserbad versenkt und bei kochendem Wasser bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft. Nach Zugabe von 4 cm 11% iger Salzsäure werden die Kölbchen fest verschlossen, zugeklammert und in einem Hitzeschrank in ihrer aufrechten Lage 15 bis 18 Minuten bei 112° gelassen. Die Flüssigkeit darf hierbei nicht ins Sieden geraten. (Die fixierte Haltung des Kölbchens und der Überschuß an Salzsäure ist nötig, damit das eingetrocknete Material mit Sicherheit von Flüssigkeit bedeckt bleibt.) Bei beendeter Hydrolyse hat sich das Material von der Glaswand rest-

los abgelöst und schwimmt als feines, weißes Häutchen an/der Oberfläche. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit mitsamt dem leicht zerfallenden Häutchen unter mehrfachem Nachwaschen mit Aqu. dest. quantitativ in ein 10-ccm-Meßkölbchen mit eingeschlif-fenem Glasstöpsel überführt. Es wird durch ein kleines, gehärtetes Filter filtriert. Das Filtrat muß vollkommen klar sein.

Die Hydrolyse mit 11%iger Salzsäure habe ich aus der Arbeit von WINTERSTEIN übernommen, der festgestellt hatte, daß eine Schädigung der Galaktose während des halbstündigen Kochens nicht eintritt. Auch für meine Hydrolysebedingungen habe ich mit reiner Galaktoselösung bestätigen können, daß ein Verlust an Reduktionskraft nicht erkennbar ist. Auch bei größeren Mengen konnte ich bei Anstellung der qualitativen Probe ein Auftreten von Lävulinsäure nicht nachweisen. Daß ferner die angegebene Zeit von 15 bis 18 Minuten die optimale ist, ergibt sich aus der nachfolgenden Tabelle⁵⁾. Die Werte wurden erhalten aus einer zu diesem Zwecke hergestellten größeren Extraktmenge aus getrocknetem Hirnmaterial.

Tabelle I.

0,2 g Trockensubstanz (Gehirn). Alkoholischer Extrakt, aufgefüllt auf 100 ccm. Davon 5 ccm zur Hydrolyse und 5 ccm zur Anfangsbestimmung. Das Hydrolysat, aufgefüllt auf 10 ccm. Von dem Filtrat 7 ccm zur Reduktionsbestimmung.

Die Hydrolyse ist bei 110° ausgeführt.

Zeit	ccm n/200 Na ₂ S ₂ O ₃	mg Galaktose	mg Cerebrosidzucker	% Cerebrosid
15 Minuten	0,75	0,280	0,140	9,20
20 „	0,76	0,278	0,138	9,06
45 „	0,90	0,244	0,104	6,85
60 „	0,92	0,240	0,100	6,58
Salzwert	1,85	0,030		
Blindwert	1,95	0,010		
Anfangswert	1,44	0,120		

⁵⁾ Diese Werte gelten für einen von unten her mit Gas geheizten Trockenschrank; späterhin habe ich mit einem elektrisch heizbaren, mit Thermoregulator versehenen Trockenschrank gearbeitet, der so eingestellt wurde, daß die Temperatur in der Höhe der Hydrolysekölbchen 112° betrug. Hierfür mußte ich als Optimum die Zeit von 30 Minuten feststellen. Demnach empfiehlt es sich also für den jeweils zu benutzenden Schrank ein für allemal eine Optimumkurve zu bestimmen.

Die hydrolysierte Flüssigkeit muß nach dem Filtrieren völlig klar sein, denn es hat sich herausgestellt, daß die Reduktionswerte unregelmäßig und zu hoch sind, wenn Teile der feinen Flocken das Filter passieren.

Auch ein in diesem Sinne angestellter Versuch mit rein dargestelltem Cerebrosid ergab das gleiche. Statt der Filtration wurde hier gleich die ganze Menge der Flocken mit in das Hagedornröhrchen übergespült. Während der Vergleichsversuch die etwa richtige Zahl von 0,98 mg Cerebrosid ergab, erhielt ich hier 1,099 mg, also fast 10% zuviel. Eine Erklärung: die Oxydation der abgespaltenen Restbestandteile (Sphingosin oder die Fettsäure) liegt zwar auf der Hand, ist aber nicht nachgeprüft.

A d 3. Eine bestimmte Menge des klaren Filtrates (zirka 7 cm) werden in ein Präparatenglas nach HAGEDORN-JENSEN pipettiert und mit einem Tropfen 0,1% iger Methylrotlösung versetzt. Dann wird mit etwa 15% iger Natronlauge (e natrio) bis zum Umschlag in Gelb neutralisiert. (Es ist ratsam, die Natronlauge vorher etwa fünf Minuten zu kochen, um die Eigenreduktionskraft zu verringern.) Nun wird bis zum ersten Umschlag in Rosa n/5 Salzsäure zugegeben und mit n/10 NaOH bis zum bleibenden, deutlichen Umschlag in Gelb versetzt. Danach wird noch einmal 1 cm n/10 NaOH zugegeben.

Dieser Alkaleszenzgrad ist nach langen Vorversuchen (auch mit anderen Indikatoren) als der richtige befunden worden. Tabelle II zeigt Versuche mit verschiedenen Alkaleszenzgraden, die angestellt wurden mit einer beliebigen Menge hydrolysierten Alkohol-extraktes. Tabelle III stellt eine Auswertung des Alkaleszenzpunktes mit reiner, abgemessener Galaktosemenge dar.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß durch Zusatz von 1 cm n/10 Natronlauge zu dem durch den Umschlag von Methylrot angezeigten Neutralpunkt die richtigen Zuckerwerte erhalten werden, daß ferner eine gewisse Schwankungsbreite im Zusatz von Natronlauge über den genannten Punkt hinaus gegeben ist, ohne daß sich die Werte merklich ändern.

Erst später fand ich die Angabe von MEYERHOF und LOHMANN⁶⁾, die zur Glykogenbestimmung ebenfalls die salzsaure Hydrolyselösung neutralisierten und die freigewordene Glukose bestimmten. Sie benutzten als Indikator Phenolphthaläin. Wie die

⁶⁾ MEYERHOF, O., und LOHMANN, Biochem. Zeitschr. 171, 381 (1926).

Tabelle II.

Hydrolyse und Anfangsbestimmung gleiche Mengen eines Extraktes. Die Anfangsbestimmung wird nach dem Kochen (kalt) mit HCl versetzt und auf die jeweils gleiche Art wie die Hydrolysebestimmung alkalisiert.

(Neutral = Umschlag des Methylrot in Gelb mit n/10 NaOH.)

		mg Galaktose Hydrolyse	Anfangsbst.	Hydrolyse ab- zügl. Anfangsbst. mg. Galaktose
Neutral		0,193	0,085	0,108
Neutral	1 ccm n/10NaOH	0,202	0,089	0,113
„	3 ccm „	0,190	0,083	0,107
„	0,1 ccm 33% NaOH	0,226	0,142	0,080
„	0,2 ccm „	0,292	0,198	0,094

Tabelle III.

Zu einer abgemessenen Menge Galaktoselösung (entspr. 0,20 mg Galaktose) werden 4 ccm 11% HCl hinzugefügt und neutralisiert. (Neutral = Umschlag des Methylrot in Gelb mit n/10 NaOH.)

Bei dem „Salzwert“ in gleicher Weise verfahren, nur ohne Zucker.

mg. Galaktose	Behandlung	ccm n/200 Na ₂ S ₂ O ₃	mg. Galaktose abzüglich Salzwert
0,20	—	1,09	0,200
„	—	1,09	0,200
—	—	2,00	—
0,20	neutr. + 0,5 ccm n/10 NaOH	0,88	
„	„ + „ „	0,90	0,213
—	„ + „ „	1,83	
0,20	„ + 1,0 ccm „	0,88	
„	„ + „ „	0,90	0,202
—	„ + „ „	1,78	
0,20	„ + 1,5 ccm „	0,92	
„	„ + „ „	0,92	0,196
—	„ + „ „	1,78	
0,20	„ + 2,0 ccm „	0,96	
„	„ + „ „	0,92	0,173
—	„ + „ „	1,71	

umstehende Tabelle V zeigt, konnte ich mit dieser Methodik bei den von mir benutzten Mengen brauchbare Resultate nicht erzielen. Allerdings ist zu bemerken, daß ich im Gegensatz zu MEYERHOF und LOHMANN nur mit der vorgeschriebenen Menge n/200 Ferrizyankaliumlösung (2 ccm) gearbeitet habe, und daß ich die Nachprüfung — wie für meine Zwecke erforderlich — mit Galaktoselösung anstellte, die gegen einen veränderten Alkaleszenzgrad sehr viel empfindlicher ist als Glukose⁷⁾.

Durch die Zugabe von Salzsäure und Natronlauge wird (wie das auch MEYERHOF und LOHMANN bemerken) schon eine gewisse Titerabnahme des Ferrizyankaliums bewirkt, die aber, wie ich feststellte, als immer gleichbleibender „Salzfehler“ ausgeschaltet werden kann. Es kommt also zu einer Serie mit gleichen Mengen Salzsäure angesetzter Hydrolysen eine Salzbestimmung in der Weise hinzu, daß die betreffende Menge Salzsäure (in unserem Falle 4 ccm) in der oben beschriebenen Weise neutralisiert und nach HAGEDORN-JENSEN bestimmt wird.

Ad 4. Die so neutralisierten Flüssigkeiten (Hydrolyse- und Salzbestimmung) werden in dem geeichten Präparatenglas auf 17 ccm mit Aqu. dest. aufgefüllt und nach Zusatz von 2 ccm n/200 Ferrizyankaliumlösung wird die Bestimmung in der vorgeschriebenen Weise zu Ende geführt.

Da bekanntlich die Galaktose dem Ferrizyankalium gegenüber ein etwas anderes Reduktionsvermögen aufweist als Glukose, hat es sich als notwendig herausgestellt, eine entsprechende neue Galaktosekurve aufzustellen, die aber — wie besonders betont werden muß — auf ein Flüssigkeitsvolumen von 17 ccm bezogen ist. (Tabelle am Schlusse der Arbeit.) Es wurde zur Aufstellung der Kurve das Galaktosepräparat „reinst“ von MERCK benutzt, das längere Zeit bei 50° und über Schwefelsäure getrocknet war. Mit dieser reinen Galaktoselösung wurde dann auch nachgewiesen, daß innerhalb des hier angegebenen Tabellenbereiches der Zusatz von Salzsäure und Natronlauge belanglos ist, wenn der dafür austitrierte Salzfehler abgezogen wird. Dabei wurde so vorgegangen, daß eine genau abgewogene Menge Galaktose in Aqu. dest. gelöst, entsprechend verdünnt und die Lösung aus einer Mikrobürette in die Präparatengläser abgelassen wurde. Hierzu kam überall die gleiche Menge 11%iger Salzsäure, es wurde in der

⁷⁾ PUCHER u. FINSCH, Journ. of biolog. Chemistry, V. 76, 1928, S. 331.

angegebenen Weise neutralisiert und die Reduktionsbestimmung angeschlossen. Die nachfolgenden Zahlen, die zehn Punkten der Galaktosekurve entsprechen, zeigen die gute Übereinstimmung in allen Bereichen.

Tabelle IV.

abgemess. mg Galaktose	+ HCl + NaOH	wiedergefunden: „Salzwert“ abgezogen	unbehandelt
0,040	0,090	0,046	0,040
0,080	0,120	0,076	0,076
0,120	0,158	0,114	0,118
0,160	0,204	0,160	0,160
0,200	0,244	0,200	0,202
0,240	0,288	0,244	0,240
0,280	0,322	0,278	0,278
0,320	0,360	0,316	0,311
0,360	0,400	0,356	0,362

Der „Salzwert“ entspricht einer scheinbaren Galaktosemenge von 0,044 mg.

In ganz derselben Weise wurden auch die Angaben MEYERHOF's nachgeprüft. Es zeigte sich aber, wie aus Tabelle V ersichtlich ist, daß schon der Salzwert außerordentlich hoch ist. Nach dessen Abzug kommt man jedoch nicht auf den gewünschten Wert.

Tabelle V.

Bestimmte Mengen einer Galaktoselösung werden auf dreifache Weise mit der HAGEDORN-JENSEN-Methode bestimmt:

1. Lösung in Aqu. dest., unbehandelt.
2. Lösung in Aqu. dest. plus 4 ccm 11% HCl, neutral. gegen Methylrot.
3. Lösung in Aqu. dest. plus 4 ccm 11% HCl, neutral. gegen Phenolphthalëin nach der Methode von MEYERHOF und LOHMANN.

Unbehandelt	Methylrot	Phenolphthalëin
0,040	0,041	0,099
0,116	0,118	0,069
0,191	0,193	0,143
0,296	0,298	0,200

A d. 5. Zur Anfangsbestimmung genügen 2 ccm der gut umgeschüttelten, alkoholischen Lösung, die unmittelbar in das Prä-

paratenglas hineinpipettiert und im siedenden Wasserbad zur vollständigen Trockne abgedampft werden. Spuren zurückbleibenden Alkohols können die nachfolgende Reduktionsbestimmung auf das empfindlichste stören. Zu dem eingedampften Extrakt werden 4 bis 5 ccm Wasser hinzugegeben und 10 bis 15 Minuten im siedenden Wasserbad gehalten. Es bildet sich eine trübe Emulsion, in der auch größere Flocken schwimmen. Nach dem Auffüllen auf 17 ccm werden 2 ccm Ferrizyankalium hinzugesetzt und die Ansätze in der üblichen Weise weiter behandelt⁸⁾.

Dieser so erhaltene Anfangswert in Galaktose ausgedrückt, enthält alle diejenigen reduzierenden Substanzen, die auch ohne Hydrolyse unmittelbar nachweisbar sind. Unter der Voraussetzung, daß diese Stoffe ihren Reduktionswert unter den Hydrolysebedingungen nicht verringern, sind wir genötigt, diesen Wert vom Hydrolysewert abzuziehen, weil er ja darin mit enthalten ist. Erst auf diese Weise erhalten wir den Reduktionswert, der nur dem nach der Hydrolyse abgespaltenen Stoff entspricht. Hierfür kommt nur die Galaktose der Cerebroside in Frage. Der Anfangswert ist keineswegs unbedeutend und darf nicht — wie das bisher immer geschehen ist — vernachlässigt werden.

Ich habe im einzelnen nicht alle Stoffe verfolgt, die diesen Anfangswert ausmachen, nur dem Kreatin habe ich besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Denn hier liegt der besondere Fall vor, daß sich unter den Bedingungen der Hydrolyse der anfangs niedrige Reduktionswert erhöhen könnte. Es war nämlich anzunehmen, daß das im Gehirn fast ausschließlich vorhandene Kreatin sich bei der Erhitzung mit Salzsäure in Kreatinin umwandeln würde. Nun ergibt aber das Kreatinin bei der Reduktion mit Ferrizyankali einen viel höheren (nach HOLMES⁹⁾ einen doppelt so hohen) Wert als das Kreatin und es würde demnach der Hydrolysewert um so viel zu hoch sein, als das Plus des Reduktionswertes vom neugebildeten Kreatinin gegenüber dem Kreatin ausmachen würde. Alles kam also darauf an, wieviel Kreatin und

⁸⁾ Ich habe späterhin diese Anfangsbestimmung dahingehend abgeändert, daß ich nach dem Kochen in Wasser eine Fällung mit Zinksulfat-Natronlauge vornahm. Die Begründung und genauere Beschreibung erfolgt demnächst in der Bioch. Zeitschrift in einer kleinen Mitteilung als „Fortgesetzte Cerebrosideuntersuchung“. Für die ersten experimentellen Untersuchungen ist aber die hier angegebene Methode benutzt worden.

⁹⁾ HOLMES, B. E., Biochemical journal 20, 595 (1926), 21, 412 (1927).

wieviel Kreatinin in der sogenannten Anfangsbestimmung enthalten sind. Je größer der Anteil an Kreatin ist, um so größer muß der Fehler sein, je größer der Kreatininanteil ist, um so kleiner ist der Fehler, denn in dem letzteren Falle würde das gesamte Kreatinin aus der Hydrolysebestimmung herausgestrichen werden können.

Zunächst stellte ich erst einmal fest, daß tatsächlich bei der hier angewandten Extraktionsart das Kreatin quantitativ in den Alkohol übergang. Ein alkoholischer Hirnextrakt wurde hydrolysiert, filtriert und nach der Neutralisation wurde mit Pikrinsäure kolorimetrisch sein Gehalt an Kreatinin festgestellt. Es war in drei verschiedenen Extrakten eines Kaninchengehirns

0,0923%	}	Gesamtkreatinin enthalten. (BEKER ¹⁰) findet z. B.
0,0910%		
0,0929%		

0,051 bis 0,071%.) Um nun das Verhältnis von Kreatin zu Kreatinin in der „Anfangsbestimmung“ ausfindig zu machen, wurde folgendermaßen verfahren: In einer etwas größeren Extraktmenge wurde in gewöhnlicher Weise eine Anfangsbestimmung angesetzt. Nach dem Kochen wurde mit Trichloressigsäure gefällt und durch ein gehärtetes Filter filtriert. Ein Teil dieses völlig klaren Filtrates wurde sofort auf seinen Gehalt an Kreatinin untersucht, ein anderer Teil erst nach einem 15 Minuten langen Aufenthalt bei 110° nach Zusatz von soviel Salzsäure, daß die Lösung 11% HCl enthielt. In diesem zweiten Teil war in mehrfach wiederholten Versuchen immer nur ein Plus von 11 bis 12% gegenüber dem ersten Teil festzustellen. Das besagt also, daß nur 11 bis 12% des gesamten Kreatin-Kreatinergehaltes der „Anfangsbestimmung“ als Kreatin, 88 bis 89% als Kreatinin vorhanden sind. Dadurch verringert sich der Fehler also außerordentlich. Er besteht lediglich darin, daß 11 bis 12% des in der Hydrolysebestimmung erscheinenden Kreatinins in der Anfangsbestimmung nur mit zirka halber Reduktionskraft als Kreatin in Erscheinung treten. Da ich nicht genau weiß, den wievielten Teil der gesamten Anfangsbestimmung das Kreatinin darstellt, so setze ich zur Berechnung des größtmöglichen Fehlers den Anfangswert gleich dem gesamten Kreatinin (in Wirklichkeit ist weniger Kreatinin darin enthalten). In diesem Falle würden (nach dem in Tabelle I

¹⁰) BEKER, J. C., Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 21 (1913).

angegebenen Beispiel) 11% von 0,109 mg = 0,012 mg nur als Kreatin reduzieren, das heißt, der Hydrolysewert wäre um 0,006 mg zu hoch (zirka ein Tropfen n/200 Thiosulfat). Abgesehen davon, daß schon dieser Wert beinahe in die Fehlergrenze der Titrationsmethodik fällt, ist ja in Wahrheit der Fehler noch kleiner, weil erstens der Kreatiningehalt nur einen Teil des Anfangswertes ausmacht, und weil sich zweitens dieser „Fehler“ bei allen Bestimmungen in der gleichen Richtung bewegt, und sich somit bei Vergleichsbestimmungen mehr oder weniger ausgleicht.

Nachdem somit — soweit es zu übersehen ist — alle Fehlerquellen ausgeschaltet waren, wurde die Methodik an reinem Cerebrosid nachgeprüft, das nach der von THIERFELDER angegebenen Methodik aus Menschengehirn hergestellt wurde. Das Cerebrosid, das wir in reinen, weißen Kristallen erhielten, unterschied sich in seinen Lösungsbedingungen deutlich von dem im Protagogemenge enthaltenen Cerebrosid: während nämlich die ungereinigte „substance blanche“ noch lange Zeit nach dem Erkalten in der Schwebeliegt, fällt das reine Cerebrosid, das in warmem, 96% igem Alkohol gelöst ist, bei dem Erkalten auf 28 bis 30° aus und senkt sich sehr rasch zu Boden. Aus diesem Grunde also war es nötig, bei Bestimmung der reinen Cerebrosidlösung warm, bei gemessener Temperatur abzupipettieren und diesen Fehler entsprechend dem Ausdehnungskoeffizienten des Alkohols einzurechnen. Tabelle VI gibt die erhaltenen mg Galaktose und Cerebrosid aus 2 ccm von 100 ccm, in denen 0,1 g Cerebrosid gelöst waren. Das Überpipettieren geschah bei einer Temperatur von zirka 40°.

Tabelle VI.

0,100 g reinen Cerebroside werden in 100 ccm Alkohol gelöst. Davon gelangen je 2 ccm zur Hydrolyse, von dem auf 10 ccm aufgefüllten Filtrat 5 ccm zur Reduktionsbestimmung (= 1 mg Cerebrosid).

Die Temperatur beträgt beim Überpipettieren 40°, entspricht rund einem Fehler von 4%.

	ccm n/200 Na ₂ S ₂ O ₃		ccm n/200 Na ₂ S ₂ O ₃
Hydrolyse	0,82	} = 0,261 mg G.	1,84
	0,82		1,83
	0,84		1,82
	0,84		1,83
		Salzwert	} = 0,033 mg G.

Anfangsbst.	1,82 1,82 1,83 1,83	} = 0,034 mg G.	Titer	1,94 1,95	} = 0,011 mg G.
	Hydrolyse brutto in mg Galaktose			0,261	
	Salzwert	" " "		— 0,033	
	Hydrolyse netto	" " "		= 0,228	
	Anfangsbst. brutto in mg Galaktose			0,034	
	Leerwert	" " "		— 0,011	
	Anfangsbst. netto	" " "		= 0,023	
	Cerebrosidzucker:			= 0,228	
				— 0,023	
				0,205 mal 4,6 =	
	Cerebrosid:			0,943 mg + 4% =	
				0,9830 „	

Tabelle zur Ermittlung der Galaktosemenge aus dem Thiosulfatverbrauch.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0								450	448	445
0,1	443	440	438	435	433	430	428	425	423	420
0,2	417	415	413	410	407	404	402	400	398	394
0,3	392	390	387	384	382	379	377	374	372	368
0,4	367	364	362	359	356	354	351	349	346	342
0,5	340	338	336	333	330	327	325	322	320	318
0,6	316	314	311	308	306	304	302	299	297	294
0,7	292	290	288	285	283	280	278	275	273	271
0,8	269	266	264	261	259	256	254	252	249	247
0,9	244	242	240	237	235	232	230	228	226	224
1,0	221	218	216	214	211	209	207	204	202	200
1,1	198	195	193	190	188	186	184	181	179	177
1,2	174	172	170	167	165	162	160	158	155	153
1,3	151	148	146	144	142	140	138	135	133	131
1,4	129	126	124	122	120	118	115	113	111	109
1,5	106	104	102	100	098	096	094	092	089	087
1,6	085	083	080	078	076	074	071	069	067	064
1,7	062	060	058	055	053	051	049	046	044	042
1,8	040	038	036	033	032	030	028	026	024	022
1,9	020	018	016	014	012	010	008	006	004	002

ccm n/200 Thiosulfat = 0, ... mg Galaktose

Es muß dazu bemerkt werden, daß die letzte Reinigung der Cerebroside mit dem von THIERFELDER angegebenen Zinkreagens aus äußeren Gründen unterbleiben mußte, und daß statt dessen die Umkristallisation in Chloroform-Methylalkohol häufiger wiederholt wurde. Zum Schluß war mit der Molybdänblaureaktion nach dem Veraschen nur noch eine Spur Phosphor nachweisbar. Aus dieser letzten Verunreinigung erklärt sich auch der Fehler von zirka 2%. Vielfache Wiederholungen, die mit anderen Mengen angestellt wurden, ergaben immer den gleichen Fehler.

Zum Schluß möchte ich Herrn Professor SCHMITZ für die Anregung zu der Arbeit und die freundliche Unterstützung bei ihrer Ausführung herzlichst danken. Auch der Notgemeinschaft deutscher Wissenschaft, mit deren Hilfe die Arbeit durchgeführt wurde, sage ich an dieser Stelle meinen besten Dank.
