

VI. Über den Nachweis des Rizins in einem Futtermittel, welches an sich ein Agglutinin enthält.

Weitaus am häufigsten kommt Rizinus als Verunreinigung im Erdnussmehl vor. Gerade deshalb muss ich auf diesen mir wiederholt zur Untersuchung auf Rizinus zugesickten Kraftfutterstoff ausführlicher eingehen. Um verständlich zu werden, muss ich weiter ausholen.

1. Über Phasine im allgemeinen.

Mit dem Ausdruck Phasine habe ich durch O. WIENHAUS¹⁾ sämtliche ungiftigen Stoffe aus Pflanzensamen zusammenfassen lassen, welche nach den von mir S. 2 gegebenen Verfahren der Rizindarstellung gewonnen werden können und den Blutkörperchen gegenüber sich rizinartig verhalten. Die Kenntnis dieser Stoffe reicht noch nicht weit zurück.

Von Autoren, die auf diesem Gebiete gearbeitet haben, sind vor allen LANDSTEINER und RAUBITSCHKE²⁾ einerseits und v. EISLER und v. PORTHEIM³⁾ andererseits zu nennen.

LANDSTEINER und RAUBITSCHKE fanden gleich in vier Gattungen der Papilionaceae solche ungiftigen Blutkörperchen-Agglutinine, nämlich in *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens esculenta* und in einer *Vicia*.

v. EISLER und v. PORTHEIM fanden analog wirkende ungiftige Agglutinine in der Familie der Solanaceen, und zwar in *Datura ferox*, *Datura gigantea*, *Datura laevis*, *Datura Leichhardtii*, *Datura Metel*, *Datura Stramonium*, *Datura Wrightii* und *Datura Ceratocaula*. Da die *Datura-*

¹⁾ Zur Biochemie des Phasins. Biochem. Zeitschr. Bd. 18, 1909, Heft 3—5.

²⁾ LANDSTEINER und RAUBITSCHKE, Bakt. Zentralbl. Bd. 45, 1908, Heft 7. — K. LANDSTEINER, Hämagglutination. In Handb. d. Biochemie des Menschen und der Tiere Bd. II, 1909, S. 395. — K. RAUBITSCHKE, Die Hämagglutination. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Ther., Referate 1910, II. — Derselbe, Hämagglutinine pflanzlicher Provenienz u. ihre Artkörper. Handb. d. Techn. u. Methodik der Immunitätsforsch., I. Ergänzungsband 1911, S. 625.

³⁾ v. EISLER und v. PORTHEIM, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Ther. 1908, Teil I, Abt. 1, S. 151. — Dieselben, Ber. d. Deutschen Bot. Ges. Jahrg. 29, 1911, Heft 7, S. 419.

arten für die Ernährung der Haustiere gar nicht in Frage kommen, so haben wir es also im wesentlichen mit Bohne, Erbse, Linse, Wicke hier zu tun.

Es schien mir von grossem Interesse, in der Familie der Papilionaceen weiter zu forschen und die Ergebnisse der Genannten zu bestätigen. Dies habe ich mit WIENHAUS getan. Da es uns überflüssig schien, für die ungiftige agglutinierende Substanz aus jedem Pflanzensamen einen eignen Namen zu geben, so haben wir den Sammelnamen Phasin dafür eingeführt, der von der am genauesten studierten Samenart, nämlich von *Phaseolus vulgaris*, abgeleitet ist. Wir stellten das Phasin zunächst aus dieser Samenart dar und überzeugten uns von seiner starken Wirksamkeit. Ich habe sowohl für *Phaseolus* als für zahlreiche andere Papilionaceensamen immer eine und dieselbe sehr einfache Darstellungsmethode benutzt, die sich an die zweite (s. S. 2) Methode der Rizingewinnung anschliesst. Die betreffenden Samen wurden, falls es möglich war, geschält und das Samenpulver mit der fünffachen Menge 0.9 %iger Kochsalzlösung nach vorherigem Zusatz von etwas Toluol 24 Stunden lang bei 38° digeriert und dann abgepresst. Die Pressflüssigkeit wurde neutralisiert und filtriert. Das Filtrat wurde mit dem gleichen Volumen 96 %igem Alkohol versetzt und gewartet, ob ein Niederschlag entstand. War er sehr unbedeutend, so wurde mit dem Alkoholzusatz fortgefahren, bis ein filtrierbarer Niederschlag sich bildete. Dieser mit Alkohol nachgewaschene Niederschlag wurde abgesaugt und auf dem Filter oder auf Tonplatten im luftverdünnten Raume getrocknet und pulverisiert, noch ehe er alles Wasser verloren hatte. Vor der Benutzung wurde der Wassergehalt, Aschengehalt und der in physiol. Kochsalzlösung unlöslich gewordene Anteil bestimmt und in Abrechnung gebracht.

Was das Phasin von *Phaseolus vulgaris* anlangt, so habe ich diese Versuche kürzlich wieder aufgenommen. Mit einem schon 3 Jahre alten Präparate, das 6.1 % Asche enthielt, bekam ich die in nachstehender kleinen Tabelle enthaltenen Werte.

(Siehe die Tabelle auf S. 58.)

Bei Vollblut sind die Zahlen nicht so hoch wie bei Blutkörperchen. Von andern Blutarten, welche sich agglutinieren lassen, nenne ich in der Reihenfolge ihrer Brauchbarkeit das der Taube, des Pferdes, des Meerschweinchens, des Schweines,

Tabelle III.

Grenze der Wirksamkeit für Phaseolusphasin.

Nummer	Blutart:	Totale Agglutination erfolgte noch bei
1	Katzenblutkörperchen	1: 271 588
2	Hundeblutkörperchen	1: 67 897
3	Menschenblutkörperchen	1: 54 274
4	Hühnerblutkörperchen	1: 67 897
5	Kaninchenblut	1: 66 666
6	Rattenblut	1: 2 715

des Sperlings, des Igels, des Frosches, des Flussaales und des Karpfens. Rinderblut wird nur von grossen Dosen unseres Phasins beeinflusst und zwar mehr hämolysiert als agglutiniert. Ein Blut, welches sich durch Bohnenphasin gar nicht beeinflussen liesse, habe ich überhaupt nicht gefunden.

Die Technik der Versuche war dieselbe wie bei den S. 7 besprochenen Rizinusversuchen. Nach meinen Angaben hat die Firma Merck schon 3 vor Jahren Phasin dargestellt, das noch heute brauchbar ist. Wie das Rizin, so wirkt auch das Bohnenphasin nicht etwa nur auf Blutzellen, sondern auch auf Zellen vieler anderer Gewebe, so z. B. auf Gehirnzellen agglutinierend. Ich muss mir aber versagen, an dieser Stelle auf diese Wirkungen einzugehen.

Von den sehr zahlreichen Varietäten des *Phaseolus vulgaris* prüfte ich mit WIENHAUS die gewöhnliche weisse Bohne, die Flagelot-Wachsbohne, die Schlachtschwert-Stangenbohne, die Holsteiner Perlbohne und die römische Wachsbohne. Sie wirkten alle, aber natürlich nicht gleich stark. Von andern *Phaseolus*-arten wurden mehrere, wie z. B. *Phaseolus Mungo*, *Phaseolus erectus*, *Phaseolus ensiformis gigas* und die echte Mondbohne, *Phaseolus lunatus* geprüft; aber der Erfolg war fast Null. Man kann also keineswegs behaupten, dass, wenn man eine Art phasinreich gefunden hat, dies ohne weiteres auch für alle andern Arten derselben Gattung Geltung habe, und natürlich noch weniger für die ganze Unterfamilie oder Familie. So ist bei den Solanaceen nur *Datura* phasinhaltig, aber *Hyoscyamus* und andere nahe

verwa
versch
Phasin
uns e
ameri
die V
Teve
Vicia
Alle
wandt
Wirkt
versag
Futte
die au
ferner
Vicia
und V
auch
Lath
mit E
blut,
der S
agglu
Have
bore
Robi
mult
nachg
Papil
auf r
schäff
merk
der
ein A
falls
aber
tung

verwandten Gattungen nicht. Für Erbsen und Linsen und verschiedene Spielarten derselben konnten wir den Gehalt an Phasin bestätigen. Die Saubohne, *Vicia faba*, wurde von uns ebenfalls in verschiedenen Varietäten untersucht, so die amerikanische Puffbohne, die schottische Grantonbohne, die Weserpferdebohne, die Teverolle de Picardie, die Teverolle de Lorraine, die *Vicia mazagana*, *Vicia unica*, *Vicia makrochloris*, *Vicia atra* und *Vicia circularis*. Alle diese Varietäten der Saubohne bzw. die ihr nahe verwandten Arten enthalten, wie wir fanden, ein Phasin, dessen Wirkung bei keiner der Blutarten, welche probiert wurden, versagte. Von andern *Vicia*-arten fanden wir phasinhaltig die Futterwicke, *Vicia sativa* und zwar auch die spanische, die aus Finnland, die aus Dalekarlien und die aus Kapetown, ferner die *Vicia leucosperma*, *Vicia villosa*, *Vicia hybrida*, *Vicia narbonensis*, *Vicia lutea graminea*, *Vicia segetalis* und *Vicia pseudocracca*. Mit FR. ASSMANN¹⁾ wies ich Phasine auch noch in Platterbsen, und zwar in *Lathyrus odorus*, *Lathyrus vernus* und *Lathyrus tingitatus* nach. Die dabei mit Erfolg benutzten Blutarten waren Menschenblut, Katzenblut, Pferdeblut, Hammelblut und Aalblut. Die Bohnen der Soja *hispida* enthalten, wie wir fanden, ein recht stark agglutinierendes Phasin. LAFAYETTE B. MENDEL²⁾ in New Haven (Connecticut) hat Phasine auch noch in *Caragana arborescens*, *Baptisia versicolor*, *Gymnocladus canadensis*, *Robinia Pseudacacia*, *Trifolium pratense*, *Phaseolus multiflorus*, *Vicia gigantea* und in *Wistaria sinensis* nachgewiesen. Alle diese Pflanzen gehören in die Klasse der Papilionaceen. Ich werde in einem späteren Teile dieser Arbeit auf mehrere dieser Phasine, mit denen ich mich ebenfalls beschäftigt habe, zurückkommen. Hier zunächst nur noch die bemerkenswerte Tatsache, dass MENDEL auch in einem Vertreter der Klasse der Cruciferae, nämlich in *Hesperis matronalis* ein Agglutinin fand. Ich habe die Samen der Nachtviole ebenfalls auf Phasin verarbeitet, fand die dabei gewonnene Substanz aber völlig unwirksam. Ich muss daher MENDELS Behauptung, dass auch unter den Kreuzblütern phasinhaltige

¹⁾ Beiträge zur Kenntnis pflanzlicher Agglutinine. PFLÜGERS Arch. Bd. 137, 1911, S. 489.

²⁾ Archivio di Fisiologia vol. 7, 1909, p. 168 (Fano-Festschrift).

Pflanzen sich finden, als bis jetzt noch nicht bestätigt ansehen. Auch in der Klasse der Schmetterlingsblüter enthalten keineswegs alle Gattungen ein Phasin. So habe ich, um nur einige zu nennen, z. B. die Samen des Hartheu, *Trigonella Foenum graecum*, des Goldregen, die von *Cajanus indicus*, der Kronenwicke, *Coronilla scorpioides* und die des gewöhnlichen Wiesenklees, *Trifolium pratense* — letztere entgegen der Angabe MENDELS — phasinfrei gefunden. Der Verwandtschaft mit Rizinus wegen habe ich auch die Samen zweier einheimischen Euphorbiaceen, *Euphorbia exigua* und *Euphorbia pilosa* untersucht, aber frei von Agglutinin gefunden. Wie das Rizin auch auf mit Formalin leicht angehärtete Blutkörperchen wirkt, so tun dies auch die Phasine. Wie Rizin auch auf ausgelaugte Stromata wirkt, so ist dies auch bei den Phasinen der Fall; es bildet sich zwar nicht ein kompaktes grosses Koagulum, wohl aber eine Unzahl kleiner Klümpchen. Die Einspritzung von Phasinen unter die Haut von Katzen, Meerschweinchen und Kaninchen in der hundertfachen, ja tausendfachen Menge der vom Rizin tödlichen Dose rief keine Störungen des Wohlbefindens hervor. Die Unterscheidung der Phasine in den Futtermitteln unserer Haustiere, also z. B. in Bohnenmehl, vom Rizin kann daher durch den Einspritzversuch leicht gemacht werden, während der einfache Agglutinationsversuch zu den grössten Irrtümern führen und Rizin vortäuschen würde. Die Angabe, dass in den gewöhnlichen Futtermitteln unserer Haustiere keine agglutinierenden Stoffe vorkämen, ist irrig. Ich habe nun gefunden, dass in Wicken- und Saubohnenmehl das Agglutinin durch einstündiges Erhitzen des betreffenden Auszugs auf 70° seine agglutinierenden Wirkungen völlig verliert. Bei beiden tritt statt dessen eine hämolytische Wirkung auf. Falls bei diesen 2 Futtermitteln nach dem einstündigen Erhitzen auf 70° die agglutinierende Wirkung auf Blutkörperchen andauert, ist Verdacht vorhanden, dass Rizinus anwesend ist. Es ist dann zur Kontrolle der Versuch mit Subkutaninjektion zu machen.

Bei Bohnenphasin aus *Phaseolus* hat schon WIENHAUS ganz richtig angegeben, und ich habe es jetzt von neuem bestätigt, dass einstündiges Erhitzen auf 70° die agglutinierende Kraft der Auszüge ganz und gar nicht be-

einflu
eine s
zuste
sich
scheid
werde
Erbs
seine
diese
perat
aber
schon
arten
wirk
nicht
Phas
dahe
Rizin
Phase
Niede
festge
Rizin

genar
von
nicht

die S
wollt
geste
und
unter
orden

gena
der
wied
den
Phas
verst
die

einflusst. Im Gegenteil ist dies die bequemste Methode, sich eine sterile, gut filtrierbare Lösung von Phaseolusphasin herzustellen. Auch Erbsen- und Linsenphasin verhalten sich ähnlich. Hier muss also unter allen Umständen zur Entscheidung, ob Rizinus vorliegt, noch ein weiterer Versuch gemacht werden. Ich habe nämlich gefunden, dass das Phasin von Erbse, Linse und Wicke bei 70° für einige Blutarten seine Wirkung behält, für andere aber nicht. So wirken diese drei Phasine nach einstündigem Erhitzen auf diese Temperatur noch prompt auf Kaninchenblut, auf Taubenblut aber gar nicht mehr. Phaseolusphasin wirkt dagegen, wie schon gesagt wurde, nach dieser Erhitzung noch auf alle Blutarten agglutinierend. Bei einstündigem Erhitzen auf 75° wirken Erbsen-, Linsen- und Wickenphasin überhaupt nicht mehr, Phaseolusphasin aber wohl noch. Um Phaseolusphasin von Rizin zu unterscheiden, bedarf es daher entweder des Präzipitationsversuches mittels Rizinserum oder des Einspritzversuches am Tier. Dass Phaseolus-, Erbsen- und Linsenphasin mit Rizinserum keinen Niederschlag geben, wurde durch besondere Versuche von mir festgestellt. Wicken- und Saubohnenphasin geben übrigens mit Rizinserum auch keinen.

Mit Hilfe der genannten Methoden lässt sich also in allen genannten Hülsenfrüchten Rizin sicher ermitteln, in Bohnenmehl von *Phaseolus vulgaris* und ihm nahestehenden Varietäten aber nicht ohne den Tierversuch oder den Versuch mit Rizinserum.

Ganz verkehrt wäre es, wenn man Rizin lediglich durch die Stärke der Agglutination von den Phasinen unterscheiden wollte. So wirkte z. B. aschefrei gerechnetes, von mir dargestelltes Linsenphasin noch bei 1:100 000 auf Hunde- und Igelblut total agglutinierend ein. Auch die weiter unten noch zu besprechenden Phasine besitzen z. T. eine ausserordentlich starke Agglutinationswirkung für einzelne Blutarten.

Zum Schluss ist noch zu erwähnen, dass alle Phasine genau wie das Rizin aus ihrer Verbindung mit dem Stroma der roten Blutkörperchen durch verdünnte Salzsäure wieder freigemacht werden können. Neutralisiert man den Brei nach einiger Zeit und filtriert, so geht das freigemachte Phasin ins Filtrat und kann sofort zu einem neuen Agglutinationsversuche benutzt werden. In dieser Beziehung ähneln also die Phasine dem Rizin ausserordentlich.

2. Über Darstellung und Wirkung des Erdnussphasins.

Im Samen von *Arachis hypogaea* ist schon wiederholt nach einem Agglutinin gesucht worden. Der erste, der eins darin fand, war ich selbst. In meinem Lehrbuch der Intoxikationen¹⁾ heisst es: „In dem Erdnusskuchen lässt sich ein für einzelne Blutarten agglutinierend wirkender Stoff nachweisen.“ Der Name Phasin wurde von mir erst später eingeführt. Unter Nichtachtung meiner Angabe äussern sich MIESSNER und REWALD²⁾ in einer sehr eingehenden Arbeit über Rizinusnachweis in Futterkuchen: „Es kann als erwiesen angenommen werden, dass in den bei uns gebräuchlichsten Futtermitteln aus Pressrückständen (wie Rübkuchen, Baumwollsaatmehlkuchen, Leinkuchen, Erdnusskuchenmehl, Sonnenblumenmehl und Bohnen) keine Körper enthalten sind, die eine Konglutination von roten Blutkörperchen hervorrufen.“ Dass dieser Satz für Bohnen gänzlich irrig ist, man mag nun darunter Phaseolus oder Faba verstehen, ist vorhin schon dargetan. Dass er auch für Erdnussmehl irrig ist, soll das nachstehende zeigen. Auch LAFAYETTE MENDEL³⁾ hat Erdnussmehl mit Hilfe von nicht weniger als elf Blutarten untersucht und konstatiert, dass keine dieser Blutarten agglutiniert werde. Auch ich selbst habe bei einigen mit WIENHAUS angestellten Versuchen unter Benutzung von drei Blutarten, die gerade zur Verfügung standen, keine Spur von Agglutinin in der Erdnuss gefunden. Zum Glück hat mich dies jedoch nicht abgehalten, meine Versuche vom Jahre 1906 weiter fortzusetzen und zwar erst mit HERM. FEUERHACK,⁴⁾ dann weiterhin allein.

Sämtliche Versuche wurden erst mit Erdnussauszügen, dann mit gereinigtem Erdnussphasin angestellt. Das Phasin wurde in der Weise dargestellt, dass das entfettete Erdnussmehl mit der fünffachen Menge 0.9 % Kochsalzlösung und etwas Toluol 24 Stunden bei 38° ausgezogen wurde. Die durch Abpressen des Breies gewonnene Flüssigkeit wurde mit Natriumkarbonat neutralisiert, filtriert; das Filtrat wurde mit dem

¹⁾ Zweite Aufl. Bd. 2 (Stuttgart 1906), S. 594.

²⁾ Die Konglutination der roten Blutkörperchen durch Rizinussamen. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Ther. Bd. 2, 1909, S. 345.

³⁾ Archivio di Fisiologia vol. 7, 1909, p. 170.

⁴⁾ Über Erdnussphasin und Rizin. Diss. Rostock, 1912.

doppelten Volumen Alkohol gefällt, rasch vom Alkohol befreit und getrocknet. Das so gewonnene Präparat enthielt 8.81 % Asche und 12.46 % Feuchtigkeit. Zum Gebrauch wurde es mit 0.9 % Kochsalzlösung in der Reibschale 1:100 angerieben und nach 24stündigem Stehen filtriert. Der ungelöst bleibende Teil wurde in Abzug gebracht.

Sowohl der Erdnussauszug als auch das Phasin hatten keine Spur von agglutinierender Einwirkung auf das Blut von Meerschweinchen, Ratte, Pferd, Hund, Taube, Huhn und Seehase. Nicht in allen, aber in der Mehrzahl der Fälle wurde auch Rinderblut nicht beeinflusst, in einigen wenigen Fällen dagegen wieder sehr stark. Bei Ziegenblut kam sowohl Agglutination als Hämolyse vor. Langes Stehen des Blutes schien bei Rinderblut den positiven Ausfall der Versuche zu begünstigen.

Stets positiv war dagegen der Ausfall der Agglutinationsprobe mit genügend starken Lösungen von reinem Phasin auch bei ganz frischem Blut des Schweines, der Katze, des Kalbes, des Hammels, des Kaninchens und des Menschen. Dass die Erdnuss ein Agglutinin enthält, ist mithin sicher erwiesen.

Gegen Pepsin (mit Salzsäure), gegen Trypsin (mit Natrium carbonicum) und gegen Papain erwies sich das Erdnussphasin bei 48stündiger Einwirkung im Brüteschrank wie das Bohnenphasin resistent.

Bei innerlicher Eingabe, sowie bei Einspritzung unter die Haut von Kaninchen, Meerschweinchen und eines Kalbes rief das Erdnussagglutinin keine Störungen der Gesundheit hervor. Es gehört also infolge seiner Ungiftigkeit durchaus in die Gruppe der Phasine und zum Glück in die Untergruppe der bei 70° binnen einer Stunde völlig denaturierten.

3. Über die Unterscheidung des Erdnussphasins vom Rizin in Gemischen.

Ich habe mir viele Male Gemische teils von Erdnussmehl und Rizinusmehl, teils von Erdnussauszug und Rizinusauszug gemacht und festgestellt, wie gross der Überschuss an Erdnuss sein darf, um darin noch scharf das Rizin nachzuweisen. Die Methode des Nachweises kann eine zweifache sein. Entweder

extrahiert man bei 38°, muss aber dann eine Blutart verwenden, auf die Erdnussphasin ohne Einwirkung ist; oder man extrahiert bei 70° bzw. man erhitzt den fertigen Auszug, welcher Rizinus und Erdnuss enthält, für eine Stunde auf 70° C., kann dann aber jede beliebige Blutart verwenden, da ja das Erdnussphasin unwirksam geworden ist. Eine völlige Ausfällung erfolgt übrigens bei 70° keineswegs. Ich will für beide Fälle ein Beispiel anführen.

15 ccm einer Mischung, die in jedem Kubikzentimeter das Lösliche aus 200 mg Erdnusskuchenmehl und 0.4 mg Rizinussamen (schalenfrei, aber nicht entölt) enthält, werden mit 10 ccm 2%iger Taubenblutkörperchensuspension mittags gemischt. Es bildet sich schon abends eine deutliche Agglutination aus, die am andern Morgen total ist. Die über dem Agglutinat stehende Flüssigkeit wird jetzt entfernt, das Agglutinat mit 0.9%iger Kochsalzlösung mehrmals durch Dekantieren gewaschen und dann auf ein Filter gebracht. Nach dem Abtropfen der letzten Tropfen Waschflüssigkeit wird der Filterrückstand in einer kleinen Reibschale mit 1 ccm Wasser, dem 3 Tropfen verdünnter Salzsäure zugesetzt worden sind, verrieben. Eine Stunde später wird mit Natriumkarbonat neutralisiert, wobei sofort eine feste braune Masse sich absetzt und diese liefert, auf ein Filter gebracht und kubikzentimeterweis mit physiologischer Kochsalzlösung nachgewaschen, ein helles, kaum gelbliches Filtrat. Zu diesem werden, nachdem es auf 8 ccm gebracht ist, 2 ccm 5%ige Menschenblutsuspension gesetzt und als Kontrolle zu 8 ccm physiologischer Kochsalzlösung ebenfalls 2 ccm solcher Suspension. Nach 18 Stunden ist die Kontrollprobe unverändert, die Hauptprobe aber agglutiniert. Auf ein Filter gegossen, lässt sie eine farblose Flüssigkeit ins Filtrat gehen.

Dieser Versuch zeigt, dass in Erdnusskuchen Rizin noch nachweisbar ist, auch wenn die Erdnussmenge die des Rizinus 500 mal übertrifft. Zur Verwendung kamen 2 Blutarten, von denen die erste nicht auf Erdnussphasin reagiert.

In einem andern Falle mischte ich Rizinus und Erdnuss ebenfalls im Verhältnis von 1:500, erhitzte aber den Auszug des Gemisches für eine Stunde auf 70°. Auch hier gelang es mir, durch Zusatz von Taubenblut das Rizin an dieses zu binden. Es erfolgte zwar keine feste Kuchenbildung; aber immerhin haftete der Bodensatz, der sich nach 16stündigem Stehen gebildet hatte, so fest aneinander, dass ich die darüberstehende Flüssigkeit abpipettieren und mehrmals einige Kubikzentimeter 0.9%ige Kochsalzlösung aufbringen konnte. Alsdann wurde zersetzt. Obwohl nur 5 mg Rizinussamen angewandt worden waren, erhielt ich eine Flüssigkeit, von der schon die Hälfte genügte, um in 5 ccm 2%igem Menschenblut binnen 6 Stunden feste Agglutination hervorzurufen.

Das Gesagte zeigt, dass es wohl möglich ist, in Erdnusskuchen zugesetztes Rizinuspulver oder in Gemischen von Erdnuss- und Rizinusauszügen milligramm-

matis
der b

geben.
unters

4. Üb

kuche
für F
zu un
etwas

Vers
ein I
pharm
von
produ
Gutac
zwar
aber
kam
schäd

besta
bewei
freien
den V
sein

physio
38° C
Teile
einstü
von 1
und d
Schon
wonne
Kuche
wenig

matische Mengen von Rizinus wiederzufinden und nach der biologischen Methode zu isolieren.

Erst nachdem dies festgestellt war, konnte ich daran gehen, eingesandte fragliche Erdnusskuchen auf Rizinus zu untersuchen.

4. Über die Untersuchung einiger eingesandter giftiger Erdnusskuchen.

In den Jahren 1911 und 1912 habe ich wiederholt Erdnusskuchen, nach deren Verfütterung heftige Durchfälle und sonstige für Rizin charakteristische Erscheinungen eingetreten waren, zu untersuchen gehabt. Es genüge, den jüngsten dieser Fälle etwas ausführlicher mitzuteilen.

Am 4. Mai 1912 meldete mir der Vorstand der Landw. Versuchsstation Hohenheim, dass dort vor einiger Zeit ein Erdnusskuchen beanstandet worden war, weil sich bei pharmakognostischer Untersuchung darin sehr grosse Mengen von Rizinusbestandteilen nachweisen liessen. Der Lieferant produzierte daraufhin das bekannte, schon so oft abgegebene Gutachten von Prof. SCHMIDT in Hamburg, dahin lautend, dass zwar zugegeben werde, es seien Rizinusbestandteile vorhanden, aber es werde bestritten, dass diese schädlich wirkten. So kam es zur Klage. Ich sollte nun die Schädlichkeit oder Unschädlichkeit der Kuchen von meinem Standpunkte aus prüfen.

Zunächst stellte auch ich mikroskopisch reichlich Schalenbestandteile von Rizinus fest. Diese sind ja aber an sich nicht beweisend, da sie, wie wir wiederholt erwähnt haben, im kernfreien Zustand ungiftig sind. Immerhin rechtfertigten sie doch den Verdacht, dass auch Kernbestandteile von Rizinus anwesend sein möchten.

Nun wurden 60 g des fraglichen Mehles mit der fünffachen Menge physiol. Kochsalzlösung 24 Stunden lang nach Zusatz von 1 ccm Toluol bei 38° C. extrahiert, dann abgepresst, die Flüssigkeit neutralisiert und in zwei Teile geteilt. Der erste Teil wurde direkt verwendet, der andere erst nach einstündigem Erhitzen auf 70° C. Von beiden Portionen wurden Mengen von 1—5 ccm zu je 5 ccm 2% Taubenblutkochsalzgemisch gesetzt und dann alle Gläschen mit physiol. Kochsalzlösung auf 10 ccm aufgefüllt. Schon nach 3 Stunden waren sämtliche Gläschen, welche den bei 38° gewonnenen Auszug enthielten, agglutiniert und zwar in Form eines festen Kuchens. Von den auf 70° erhitzten Auszugsportionen waren nach 3 Stunden wenigstens die mit 5 und mit 4 ccm fest agglutiniert. Die andern erreichten

dieses Stadium erst später. Jetzt wurde der Versuch wiederholt, nachdem sowohl der auf 70° erhitzte, als der unerhitzte Auszug 10fach verdünnt worden waren. Auch jetzt trat in allen Gläschen, welche 2—5 ccm der Auszüge enthielten, völlige Agglutination des Taubenblutes ein, nur wurde das Ende des Prozesses erst nach 16 Stunden erreicht. Parallelversuche mit Meerschweinchenblut fielen sogar noch schlagender aus, da hier auch die beiden Proben mit je 1 ccm Auszug, entsprechend 20 mg Kuchenmehl, Agglutination lieferten.

Diese Versuche beweisen, dass in dem fraglichen Erdnusskuchen reichlich Pulver von nicht denaturierten Rizinussamen enthalten ist und nicht etwa nur Schalenbestandteile. Die Agglutination kann auch nicht auf Erdnussphasin geschoben werden, denn dieses reagiert mit Taubenblut überhaupt nicht; ferner hätte es durch das Erhitzen auf 70° unwirksam geworden sein müssen.

Um auch toxikologisch die Giftigkeit darzutun, machte ich noch folgenden Tierversuch.

Ich spritzte einem Kaninchen von etwas über 2000 g am 20. Mai um 3 Uhr 5 ccm des unverdünnten, auf 70° erhitzten Auszuges unter die Haut des Rückens. Am 21. Mai frass es nicht mehr und am 22. Mai vormittags 10 Uhr 45 Minuten starb es nach einigen leichten Krampfanfällen. Der Harn des 21. Mai enthielt bereits Eiweiss; der des 22. Mai auch reichlich Zylinder.

Die sofort nach dem Tode vorgenommene Sektion ergab sulziges Ödem und einzelne Hämorrhagien in der Umgebung der Einspritzstelle. Sonstige makroskopische Organveränderungen nicht nachweisbar. Mikroskopisch im Gefrierschnitt in den Harnkanälchen reichliche Zylinder wahrnehmbar.

Da Erdnusskuchenauszug, namentlich bei 70° gehaltener, gar keine Wirkungen hat, kann der Tod des Kaninchens nur auf beigemischte Rizinussamenbestandteile bezogen werden. Die Veränderungen an der Einspritzstelle und in den Nieren sprechen auch für Rizinus. Ein halbes Gramm des fraglichen Erdnusskuchens war hier die letale Dose pro Kilogramm Kaninchen; die Giftigkeit des Kuchens ist also beträchtlich gross.

Eigentlich genügen die vorstehenden Versuche, um den Einwand des Prof. SCHMIDT zu widerlegen. Um die Reinigung des Giftes, soweit dies überhaupt möglich ist, durchzuführen, wurde jedoch noch eine zweite Versuchsreihe angeschlossen, in der das Rizin von Erdnussbestandteilen auf biologischem Wege befreit und dann von neuem auf seine Wirksamkeit geprüft wurde.

5 ccm des zehnfach verdünnten, für 1 Stunde auf 70° erhitzten Auszuges des fraglichen Erdnussmehles, entsprechend 0.1 g Mehl, wurden abends mit 5 ccm 2%igem Kaninchenblut versetzt. Früh war feste totale Agglutination eingetreten. Nun wurde die über dem Agglutinat stehende klare Flüssigkeit abgehoben und mehrmals kleine Mengen physiol. Kochsalzlösung als Waschwasser vorsichtig aufgebracht, ohne den Agglutinatkuchen zu zerstören. Alsdann wird dieser in einer kleinen Reibschale mit 2 Tropfen verdünnter Salzsäure verrieben, wobei er braunschwarz wird. Eine halbe Stunde später wird mit Sodalösung neutralisiert. In dem Augenblick, wo die Neutralität erreicht wird, wird die bis dahin schmierige Masse fest und presst farblose Flüssigkeit aus. In diesem Zustand wird durch ein ganz kleines Filter filtriert und 20 Minuten lang mit physiol. Kochsalzlösung tropfenweis nachgewaschen, bis 5 ccm Filtrat gewonnen sind. Dieses ist ganz klar und nur spurweis gelblich gefärbt. Es enthält weder Erdnussbestandteile noch Hämoglobin, sondern nur Rizin und Kochsalz. Es wird von neuem abends mit 5 ccm 2%igem Kaninchenblut versetzt und führt über Nacht von neuem totale feste Agglutination herbei. Der Versuch wurde dann wiederholt, indem erst Taubenblut und nach der Wiedergewinnung Kaninchenblut verwendet wurde. Das Ergebnis war dasselbe.

Wenn man bedenkt, dass hier nur 0.1 g Erdnussmehl verwendet wurde, und dass demgemäss auch die darin als Verunreinigung steckende Rizinmenge naturgemäss nur sehr klein gewesen sein kann, kann man dieser Methode, das Gift zu isolieren und dann von neuem zur Agglutination zu verwenden, seine Anerkennung wohl nicht versagen.

Als Experimentum crucis blieb jetzt noch die Isolierung des Rizins zum Zweck der Identifizierung durch den Tierversuch.

Zu diesem Behufe wurden 25 ccm Erdnussmehlauszug, entsprechend 5 g Mehl mit 1 ccm unverdünntem defibriniertem Menschenblut versetzt. Nach 12 Stunden wird das feste Agglutinat gewaschen, mit ClH zersetzt, neutralisiert und filtriert unter tropfenweisem Zusatz von 0.9%iger Kochsalzlösung, bis 5 ccm Filtrat erhalten sind. Diese klare, leicht gelb gefärbte Flüssigkeit wird einem Kaninchen von 1280 g unter die Haut gespritzt. Es stirbt nach 30 Stunden unter Lähmungserscheinungen.

Die Sektion ergibt sulziges Ödem an der Injektionsstelle und einzelne Blutaustritte ins grosse Netz.

Somit war im Hohenheimer Prozess der Beweis geliefert, dass sich aus dem rizinushaltigen Erdnusskuchen trotz Widerspruchs der Gegenpartei wirksames Gift rein abscheiden und sowohl durch die biologische Probe, d. h. durch Agglutination als durch die toxi-kologische als Rizin identifizieren liess.