

schütteln des Sapotoxins am besten neutral, für das Ausschütteln der Quillajasäure aber am besten schwach sauer.

Da beim Ausschütteln mittelst Isobutylalkohol bei gerichtlichen Analysen¹⁾ von Leichenteilen, falls diese nicht ganz frisch sind, stets sogenannte Leichengifte oder Ptomaine (richtiger Ptomatine) mit ausgeschüttelt werden, halte ich es für wichtig, hier auf eine Eigenschaft der Saponinsubstanzen hinzuweisen, welche sie neben der Ausschüttelbarkeit durch Isobutylalkohol mit den Leichengiften teilen. Die aus Leichen ausgeschüttelten Ptomaine wirken nämlich auf das als Reagens von Brouardel und Boutmy bezeichnete Gemisch von Eisenchlorid und frisch gelöstem Ferridcyankalium wie Morphinum auch ohne Erhitzen reduzierend und dadurch bläugend. Diese Bläuung wird nun auch von den meisten Saponinsubstanzen hervorgerufen und kann daher zu Verwechslungen Anlass geben. Ich nenne als Substanzen, welche von mir mit positivem Erfolge auf diese Reaktion geprüft worden sind, Quillajasäure, Sapotoxin, Polygalasäure (von mir, solche von Merck und solche von Hoffmann), ferner Guajakrindensaponinsäure, Chamälinin, Parillin, sowie die beiden unserer Gruppe nahestehenden Stoffe, das Helleborein und die Ipecacuanhasäure. Cyclamin und Melanthin wirken wenigstens beim Erwärmen auf unser Reagens reduzierend. Diese reduzierende Wirkung wird verständlich, wenn man bedenkt, dass unsere Substanzen eine oder mehrere Zuckergruppen im Molekül enthalten. Immerhin sind diese Zuckergruppen so fest gebunden, dass bei vorsichtiger Ausführung der Fehlingschen Probe keine Reduktion eintritt. Ammoniakalische Silbernitratlösung sowie Goldchloridlösung werden dagegen von Quillajasäure und vom Sapotoxin beim Erhitzen reduziert.

2. Hämolytische Wirkung.

Als Vorstehendes schon niedergeschrieben war, erschien eine wichtige sich mit der Hämolyse auch durch toxische Agentien beschäftigende Arbeit von Hans Koeppe²⁾, auf welche

¹⁾ R. Kobert, Ueber die Bedeutung des biologischen Giftnachweises für die gerichtliche Medizin. Ber. d. Deutsch. Pharm. Ges. Jg. 13, 1903, p. 325.

²⁾ Ueber das Lackfarbigwerden der roten Blutscheiben. I. Mitteilung. Dieses Arch. Bd. 99, p. 33, 1903.

ich durchaus mit eingehen muss. In Uebereinstimmung mit diesem Autor stellen wir zunächst fest, dass das Lackfarbigwerden der Blutkörperchen durch physikalische und pharmakologische Agentien von verschiedenen Autoren recht verschieden beurteilt wird. Rollett erklärte es noch 1900 für eine noch nicht genügend erklärte Erscheinung. P. Ehrlich¹⁾ dagegen äusserte sich noch kürzlich dahin, dass die Auflösung der roten Blutkörperchen durch Wasser zu den beststudierten Gebieten der Medizin gehört. Hamburger stellt in einer Reihe von Schriften aus den Jahren 1886—1892 den Hämoglobinaustritt aus den roten Blutkörperchen mit der Plasmolyse der Pflanzenzellen als analoge Vorgänge zusammen. Koeppe²⁾ sagt, diese Zusammenstellung erscheine ihm recht unglücklich und bringe nur Schwierigkeiten, welche an sich nicht bestehen, in die Auffassung. Hamburger lässt das Lackfarbigwerden durch den Inhalt des protoplasmatischen Netzes vor sich gehen. Koeppe³⁾ dagegen sagt: „Die Ursache des Lackfarbigwerdens der roten Blutscheiben ist eine einheitliche, nämlich die Zerstörung der halbdurchlässigen Wand, welche die roten Blutkörperchen umgibt.“ Diese halbdurchlässige Wand der roten Blutkörperchen besteht aus einem „fettähnlichen Stoffe“ oder enthält einen solchen als wesentlichen Bestandteil. Von wandzerstörenden und dadurch hämolytisch wirkenden Faktoren kennt Koeppe folgende: 1. destilliertes Wasser, 2. Wärme, 3. Wasserstoffionen, 4. Hydroxylionen, 5. eine Reihe fettlösender Stoffe.

In welche dieser Klassen gehören nun unsere Saponinsubstanzen? Koeppe erwähnt sie in dem bisher erschienenen Teile seiner Untersuchung überhaupt noch nicht und Hamburger kommt im ersten (und bis jetzt einzigen) Bande seines Lehrbuches⁴⁾ ebenfalls gar nicht auf sie zu sprechen. Wohl aber sind andere Arbeiten vorhanden, welche die Beantwortung dieser Frage erleichtern, vor allem eine sehr wichtige von F. Ransom⁵⁾. Dieser fand, dass Mercksches Saponin beim mehrstündigen Digerieren mit der halben Gewichtsmenge von (in

¹⁾ Münch. Med. Wchschr. 1903, p. 1431.

²⁾ l. c. p. 35.

³⁾ l. c. p. 88.

⁴⁾ Osmotischer Druck und Ionenlehre in den medicin. Wissenschaften. Wiesbaden 1902.

⁵⁾ Saponin und sein Gegengift. Deutsche Med. Wchschr. 1901, p. 194.

Aether gelöst zugesetztem) Cholesterin seine hämolytische Wirkung für Hundeblut völlig verliert. Er erklärt auch die antihämolytische Wirkung des Blutserums durch seinen Gehalt an Cholesterin. Das Cholesterin funktioniert im Serum, wie Ransom sich ausdrückt, als Giftableiter, während das Cholesterin der roten Blutkörperchen umgekehrt als Giftzuleiter funktioniert. Seine Beschlagnahme durch das Saponin entzieht dem Blutkörperchen einen wesentlichen Baustein seines Gerüsts und deshalb stürzt der ganze Bau zusammen. Eine Reihe von Versuchen, welche die antihämolytische Kraft von Pferdeserum gegenüber der Wirkung von Merckschem Saponin, Cyclamin und salzsaurem Solanin beweisen, stammen von E. F. Bashford¹⁾. Wie diese Schutzwirkung zustande kommt, darüber drückt er sich (p. 463) sehr vorsichtig aus: „Ob die durch Anwesenheit von Serum hervorgerufene Abschwächung der Wirkung solcher Agentien in allen Fällen auf einen im Serum natürlich vorhandenen spezifischen Antikörper zurückzuführen ist, scheint mir fraglich.“ Hideyo Noguchi²⁾ prüfte die antihämolytische Kraft von Blutserum, Milchserum, Cholesterin und Lecithin auf Mercksches Saponin. Das Gemisch wurde zu Menschenblut, Kaninchenblut und Meerschweinchenblut gesetzt. 3 mg Cholesterin genügten, um 1 mg Saponin zu entgiften. Lecithin wurde in Uebereinstimmung mit Ransom als wholly without protective action, d. h. als ganz unfähig erkannt, Saponin zu entgiften. Härten der Blutkörperchen mittelst Hayemscher Lösung oder Formalin oder Alkoholäther machte sie gegen Saponin ebenfalls ganz unempfindlich, während die Agglutination derselben durch das in meinem Institute entdeckte und als agglutinierendes Agens erkannte Ricin³⁾ Noguchi wohl noch gelang. Sein Schlusssatz lautet weit positiver als der von Bashford: „Es ist im hohen Grade wahrscheinlich, dass die antihämolytische Kraft der Sera und der Milch wenn nicht ganz so doch teilweise von ihrem Gehalt an Cholesterin abhängt.“

¹⁾ Ueber Blutimmunität. Arch. internat. de Pharmacodyn. et de Thérap. vol. II, 1901, p. 451.

²⁾ The antihæmolytic action of bloodsera, milk and cholesterin upon agaricin, saponin and tetanolysin, together with observations upon the agglutination of hardened red corpuscles. Bakt. Cbl. Erste Abt. Bd. 32, 1902, p. 377.

³⁾ Dorpater pharmakol. Instit. Arb. Bd. 3, 1889, p. 59.

In welche der fünf Klassen von Köppe gehören nun die Saponinsubstanzen nach allen Versuchen? Nach diesen meinen eigenen Untersuchungen gehören unsere Stoffe in die fünfte Klasse, d. h. zu den Substanzen, welche Fett bzw. Lecithin lösen. Diese Beziehungen zum Lecithin lassen sich in sinnfälliger Weise durch folgenden einfachen Versuch, den ich für Sapotoxin viele Male angestellt habe, dartun. Versetzt man 4 ccm einer 4%igen schwach alkalischen Lecithinsuspension in Wasser mit 2 ccm Wasser und einigen Tropfen verd. Salz- oder Schwefelsäure, erwärmt für einige Sekunden über der Flamme des Bunsenbrenners und kühlt dann ab, so fällt das Lecithin, welches vorher durch das Alkali (am besten durch NH_3) in Pseudolösung gehalten wurde, aus und bildet allmählich einen voluminösen Niederschlag. Versetzt man dagegen 4 ccm derselben 4%igen Lecithinsuspension mit 2 ccm einer 20%igen Sapotoxinlösung und einigen Tropfen verd. Mineralsäure, so wird beim Erwärmen das Gemisch wasserklar und bleibt auch nach dem Erkalten dauernd klar. Das Lecithin ist hier offenbar mit dem Sapotoxin eine Verbindung eingegangen, die auch durch Säurezusatz nicht zersetzt wird. Auch Zusatz von weiterer Säure ändert daran nichts. Das Verhältnis des Sapotoxins zum Lecithin ist in obigem Versuch wie 5:1. Bei 4:1 tritt zwar beim Erwärmen auch Lösung des Lecithins ein, aber beim Abkühlen tritt nach längerer Zeit langsam eine geringe Lecithinabscheidung ein. Bei 3:1 erfolgt in der Hitze Lösung, aber nach dem Abkühlen sehr bald reichliche Lecithinabscheidung. Eine teilweise, aber freilich unvollkommene Lösung (mit Opaleszenz) erfolgte auch noch bei 2:1, war aber nur beim Erwärmen wahrnehmbar. Dieser Versuch ist für viele Saponinsubstanzen typisch und liefert mit den Schlüsseln für ihre Blutwirkung: die roten Blutkörperchen enthalten im Stroma eine Lecithinsubstanz, die bei Zusatz von Saponinen zur Zwischenflüssigkeit gelöst wird. Versuchen wir quantitativ diesen Vorgang zu verfolgen.

Ich bestimmte möglichst genau, welche Mengen 1%iger Katzenblutkörperchensuspension in physiologischer Kochsalzlösung von 1 mg des zu den Lecithinversuchen hergestellten ganz reinen Quillajasapotoxins gerade noch gelöst wird. Es ergab sich, dass 20 ccm Körperchengemisch binnen fünf Stunden noch völlig klar von 1 mg Sapotoxin gelöst werden. Die Blutkörperchen waren in der Weise gewonnen, dass in einem Masszylinder 40 ccm defi-

briniertes Katzenblut so lange sich selbst überlassen wurden, bis sich 20 ccm Serum und 20 ccm Körperchen abgeschieden hatten. Nun enthält nach Bunge 1 kg Blut¹⁾ 1220 mg Lecithin in seinen Blutkörperchen; auf 40 g ganzes Blut kommen also $40 \times 1,22$ mg Lecithin. Auf 20 g Körperchen kommen höchstens $40 \times 1,22$ mg Lecithin und auf 1 ccm Körperchen $2 \times 1,22$ mg = 2,44 mg Lecithin. 20 ccm der 1%igen Körperchensuspension enthielten demnach höchstens $\frac{2,44}{5} = 0,48$ mg Lecithin, wahrscheinlich aber weniger.

1 mg Sapotoxin hatte also auf die Blutkörperchen, welche in toto 0,48 mg Lecithin enthielten, gerade noch eben lecithinbindend und dadurch hämolytisch eingewirkt. Wie passt dies Verhältnis von 1:0,48 nun zu den oben gefundenen Zahlen? Wir sahen, dass bei 5:1, d. h. bei 1:0,2 völlige Bindung des Lecithins an das Sapotoxin eintritt; teilweise war Bindung noch erkennbar bei 2:1, d. h. bei 1:0,5. Unser Versuch mit den Blutkörperchen besagt also, dass Hämolyse derselben schon eintritt, wenn das Sapotoxin auch nur in solcher Menge vorhanden ist, um noch nicht ganz die Hälfte des Lecithins quantitativ binden zu können. Anders ausgedrückt besagt dies, dass Blutkörperchen zerfallen, wenn ihnen auch nur die knappe Hälfte ihres Stromalecithins entzogen wird. Es wird die Aufgabe der nächsten Zeit sein, dies für verschiedene lecithinlösende oder lecithinbindende Stoffe nachzuprüfen.

Nun soll aber von mir nicht im entferntesten die Richtigkeit der Angabe von Ransom, dass Mercksches Saponin das Cholesterin der Blutkörperchen mit Beschlag belegt, bestritten werden. Im Gegenteil bin ich der erste, der für eine chemisch reine Saponinsubstanz und nicht nur für ein Handelspräparat das Verhalten zu Cholesterin nachgeprüft hat. Es gelang mir, durch 24stündiges Kochen von 10 Gramm chemisch reinem Sapotoxin mit 30 Gramm fein zerriebenem Cholesterin unter fortwährender Wassererneuerung das Sapotoxin seiner hämolytischen Wirkung fast ganz zu berauben. Ich habe mich jedoch nicht damit be-

¹⁾ Allerdings nicht gerade Katzenblut; doch dürften die Verhältnisse hier wohl dieselben sein. Wenn ich 1 g = 1 ccm setze, so ist dies nicht ganz richtig, für obige Rechnung aber genügend genau.

gnügt, das entgiftete Sapotoxin nur mit Hilfe von Blutkörperchen zu prüfen, wie meine Vorgänger es getan haben. Ich habe vielmehr auch den Nachweis geführt, dass die weiter unten noch zu besprechende ausserordentliche Giftigkeit des Sapotoxins für das Herz des Frosches am — mit Ringerscher Lösung gefüllten — Williamsschen Apparate durch die Bindung an Cholesterin fast auf Null sinkt. Ebenso werde ich weiter unten zeigen, dass die enorme Giftigkeit der Sapotoxinlösungen für in dieselben gesetzte Fische für Cholesterinsapotoxinlösungen nicht besteht.

Ich behaupte auf Grund meiner Versuche, dass die Saponinsubstanzen imstande sind sich chemisch sowohl mit den Lecithinen als mit den Cholesterinen zu verbinden. Bei der Einwirkung von Saponinstoffen auf Blutkörperchen kommen beide Wirkungen in Betracht: durch Verbindung sowohl mit dem Cholesterin als mit dem Lecithin bringt das Sapotoxin die Blutkörperchen zum Zerfall. Während aber die Cholesterinverbindung ungiftig ist und dadurch der zerstörenden Wirkung des Sapotoxins Einhalt tut, ist die Lecithinverbindung des Sapotoxins keineswegs ungiftig sondern wirkt hämolytisch und protoplasmaabtötend. Im Lichte neuerer Forschungen aus dem Ehrlich'schen Institute wird dies leicht verständlich. So fanden z. B. Preston Kyes und Hans Sachs¹⁾, dass Cobragift sich mit Lecithin verbindet, und dass die Empfindlichkeit von roten Blutkörperchen gegenüber Cobragift einzig und allein auf ihrem Lecithingehalte beruht. Die quantitativen Beziehungen von Cobragift und Lecithin entsprechen denjenigen von Ambozeptor und Komplement; je mehr Cobragift vorhanden ist, desto weniger Lecithin ist zur kompletten Hämolyse nötig und umgekehrt. Als die in der aus Cobragift und Lecithin entstehenden giftigen Verbindung wirksame Gruppe ist nach Kyes und Sachs der Fettsäurerest anzusprechen. Wie Lecithin an sich auf Blut und Herz wirkt, konnte ich ausser in der genannten Arbeit in der Literatur nicht finden; ich entsinne mich aber, dass eine alte Angabe existiert, wonach es giftig sein soll. Kyes und Sachs fanden, dass es schwach hämolytisch wirkt. In der Tat konnte auch ich zeigen, dass Lecithin

¹⁾ Berl. klin. Wochschr. Jahrg. 40, 1903, No. 2—4.

thin aus Eiern hämolytisch wirkt. Ich konnte aber weiter auch zeigen, dass es die Herztätigkeit am Williamsschen Apparate schädigt. Nach der von Langendorff und seinen Schülern¹⁾ vertretenen Ansicht, die allerdings wohl nicht durch Versuche mit Lecithin gestützt ist, wirken bei der Hämolyse ja nur die Kalisalze schädigend aufs Herz. Offenbar kommt es eben auf die Menge des Lecithins an. Ich verweise auf die mit quantitativen Angaben versehenen Versuche meines Schülers Kakowski, die demnächst als Dorpater Dissertation erscheinen. Ich erwähne die Giftwirkung des Lecithins hier nur, um dadurch noch verständlicher zu machen, dass die Verbindung des giftigen Sapotoxins mit dem giftigen Lecithin nicht ungiftig ist.

Weitere Versuche meines Institutes sollen sich mit der Darstellung und den Eigenschaften der Paarlinge der Lecithine und Cholesterine mit den verschiedenen Saponinsubstanzen und Saponinen beschäftigen. Sind wir doch jetzt durch Mauthner²⁾ einerseits und Windaus³⁾ andererseits über Cholesterine chemisch weit besser orientiert als früher. Zum Nachweis empfiehlt sich neben den alten bekannten Reaktionen mit Schwefelsäure sowie mit Jod und Schwefelsäure auch die kürzlich von Ed. Hirschsohn⁴⁾ in Dorpat angegebene mit 90%iger Lösung von Trichlor-essigsäure in Salzsäure, wobei erst eine rote, dann eine violette und zuletzt eine blaue Färbung auftritt. Die spektroskopische Prüfung zeigt erst einen Streifen im Grün an der Grenze des Blau, später (beim Uebergang der Färbung des Gemisches ins Blauviolette) einen Streifen im Rot wie saures Haematin. Sapotoxin und Lecithinsapotoxin zeigen mit demselben Reagens keine Farbenreaktion. Das von mir durch zwölfstündiges Kochen von Cholesterin mit Sapotoxinlösung hergestellte ungiftige Produkt gab diese Reaktion dagegen gut. Von den sonstigen Eigenschaften des Cholesterinsapotoxins seien hier nur kurz die folgenden angeführt. Das Cholesterinsapotoxin ist eine wasserlösliche Substanz von saurer Reaktion. Die 1%ige Lösung ist bereits opaleszent; 3–5%ige Lösungen sind sehr opaleszent und

¹⁾ E. Brandenburg: Pflügers Arch. Bd. 95, 1903, p. 625.

²⁾ Mauthner und Suida, Wiener Monatshefte für Chem. Bd. 24, 1903, p. 489.

³⁾ A. Windaus, Ueber Cholesterin. Habilitationsschrift. Freiburg 1903. Fortsetzung in Chem. Ber. Jahrg. 36, 1903, p. 3752.

⁴⁾ Pharmaz. Zentralhalle Jahrg. 43, 1902, p. 357.

kleben wie Gummi arabicum. Zusatz von einigen Tropfen verd. Schwefelsäure oder Salzsäure bringt schon bei 1%igen Lösungen eine schneeweiße Fällung hervor; bei stärkeren Lösungen ist diese sehr voluminös. Ammoniak oder Natronlauge hebt die bereits eingetretenen Fällungen wieder auf. Die 1%ige Lösung des Cholesterinsapotoxins wird auch vom gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung quantitativ ausgefällt, während Sapotoxin allein mittelst dieses Fällungsmittels sich, wie wir S. 22 gesehen haben, nicht ausfällen lässt. Auch gegen Alkohol ist das Verhalten des Sapotoxins verschieden von dem seines Paarlings, denn wässrige Sapotoxinlösungen bleiben bei Alkoholzusatz klar, während die des Paarlings eine Fällung geben.

Die entgiftende Wirkung des Cholesterins für Saponine steht keineswegs beispiellos da. Wie Ransom schon anführt, besitzt Cholesterin nach Phisalix auch auf Schlangengift immunisierende Wirkung. Wenn Fraser der Schlangengalle entgiftende Wirkung auf Schlangenbiss zuschreibt, so kommt ebenfalls das darin enthaltene Cholesterin mit in Betracht. Sehr genaue Versuche nach dieser Richtung machten Kyes und Sachs. Nach diesen Autoren hemmt Cholesterin die Hämolyse durch Cobragift in hohem Grade, gleichgültig ob Lecithin dabei anwesend ist oder nicht. Auch bei meinen Entgiftungsversuchen des Sapotoxins durch Cholesterin hatte die Anwesenheit von Lecithin keinen Einfluss. Kyes und Sachs fanden weiter, dass auch die hämolytische Wirkung des Tetanolysins durch Cholesterin sehr stark gehemmt wird. Unter solchen Umständen gewinnt das Cholesterin die Bedeutung eines Antidots von noch grösserem Werte. Es ist deshalb wohl nicht überflüssig, darauf hinzuweisen, dass innerliche Eingabe desselben leider trotzdem wertlos ist, da es nach E. Stadelmann¹⁾ vom Magendarmkanal aus nicht resorbiert wird. Es bleibt hier auch nicht unverändert, sondern geht beim Menschen in Koprosterin und beim Pferde in Hippokoprosterin über. Nur beim Hunde scheint es der Kürze des Darmkanals wegen schneller im Kot wiederzuerscheinen als die Umwandlung durch die Darmfäulnis Zeit braucht. Vinz. Humnicki²⁾ konnte das Kopro-

¹⁾ Ueber den Kreislauf der Galle. Ztschr. f. Biologie, Bd. 34, 1898, p. 1 (Jubiläum für W. Kühne).

²⁾ Ueber das Schicksal des Cholesterins im tierischen Organismus. Dissert. Freiburg in der Schweiz. 1898.

sterin der Menschenfäces in die Acetyl-, Propionyl-, Benzoyl-, Cinnamyl- und Bromacetylverbindung überführen und diese in Kristallen darstellen.

Dass es auch Hämolytica gibt, bei denen Cholesterin gar nichts nützt, haben Kyes und Sachs ebenfalls dargetan.

3. Nimmt die Empfindlichkeit des Organismus gegen unsere beiden Saponine bei wiederholter Einspritzung ab?

Nach der im Vorhergehenden entwickelten Anschauung über die antidotarische Wirkung von Cholesterin auf die Saponine liegt es nahe, zu vermuten, dass der Organismus bei wiederholter Einspritzung anfangs sehr kleiner und später grösserer Dosen von Saponinen ins Blut mit Mehrproduktion von Cholesterin im Serum reagiert und sich auf diese Weise immunisiert. Dass der Organismus vielleicht gleichzeitig auch noch andere Methoden der Saponinentgiftung anwendet, soll damit nicht etwa in Abrede gestellt werden. Der erste, welcher wichtige Versuche nach dieser Richtung hin anstellte, war J. Pohl¹⁾, der nach wiederholter Subkutaninjektion von Solaninum hydrochloricum bei Kaninchen die antihämolytische Kraft des Blutes dieser Tiere um weit über das Hundertfache steigen sah. Solche Versuche sind recht mühsam und misslingen oft. Ich wundere mich daher nicht, dass E. F. Bashford²⁾ sie nicht ohne weiteres bestätigen konnte. Ich möchte nur betonen, dass ich bei analogen Versuchen mit Quillajasäure und mit Sapotoxin ebenfalls ein Unempfindlicherwerden der Kaninchen eintreten sah. Wenn ich diese Versuche hier nicht im einzelnen mitteile, so geschieht dies, weil sie an einem reicheren Tiermateriale wiederholt und über längere Zeit ausgedehnt werden sollen. Die grosse Schwierigkeit bei denselben liegt darin, dass es nötig ist, die Giftdosen bei unsern beiden Giften sämtlich intravenös beizubringen, da Subkutaninjektionen hauptsächlich oder sogar fast ausschliesslich lokal wirken. Vom Gift darf nichts neben das Gefäss gespritzt werden, weil es hier schwere lokale Entzündung erregen würde. Aus diesen Gründen ist die hier zu lösende Aufgabe eine recht

¹⁾ Ueber Blutimmunität. Archives internat. de Pharmacodyn. et de Ther. Vol. 7, 1900, p. 1 und vol. 8, 1901, p. 437.

²⁾ Ebenda, Vol. 8, 1901, p. 101.