

Biologisches Zentralblatt

Begründet von J. Rosenthal

Herausgabe und Redaktion:

Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. C. Correns

Prof. Dr. R. Goldschmidt und Prof. Dr. O. Warburg

in Berlin

Verlag von Georg Thieme in Leipzig

Anzeigen-Annahme: Hans Pusch, Berlin SW. 48, Wilhelmstr. 28

41. Band.

Oktober 1921.

Nr. 10

ausgegeben am 1. Oktober 1921

Der jährliche Abonnementspreis (12 Hefte) beträgt 30 Mark
Zu beziehen durch alle Buchhandlungen und Postanstalten

Den Herren Mitarbeitern stehen von ihren Beiträgen 30 Sonderabdrucke kostenlos zur Verfügung; weitere Abzüge werden gegen Erstattung der Herstellungskosten geliefert.

Inhalt: A. Pratje, Makrochemische, quantitative Bestimmung des Fettes und Cholesterins, sowie ihrer Kennzahlen bei *Noctiluca miliaris* Sur. S. 433.

G. Krediet, Ovariotestes bei der Ziege. S. 447.

E. Mangold, Tierische Hypnose bei Echinodermen. S. 456.

H. Nachtsheim, Sind haploide Organismen lebensfähig? Mit 1 Abbildung. S. 459.

Referate: H. Klaatsch, Der Werdegang der Menschheit und die Entstehung der Kultur. S. 479.

(Aus der Biologischen Anstalt auf Helgoland, der physiol.-chem. Abteilung des Physiologischen Instituts und dem Zoologischen Institut der Universität Breslau.)

Makrochemische, quantitative Bestimmung des Fettes und Cholesterins, sowie ihrer Kennzahlen bei *Noctiluca miliaris* Sur.

Von Dr. phil. nat. et med. **Andre Pratje**,
Oberassistent am Anatomischen Institut Halle a. S.

Das Fett der *Noctiluca* habe ich (1921, p. 22—45) mit verschiedenen Färbe- und Lösungsmethoden untersucht und auch die Physiologie des Fettes, seine Entstehung und Bedeutung für den Organismus und seine Verbreitung in der Zelle näher erörtert. Als mir nun im Herbst 1920 größere Mengen von *Noctiluca*-Material zur Verfügung standen, erschien es mir wünschenswert, meine früheren Untersuchungen durch eine makrochemische Bestimmung des Fettes zu ergänzen, zumal derartige makrochemische, quantitative Fettbestimmungen bei Protozoen überhaupt bisher kaum vorliegen, was vor allem wohl darauf zurückzuführen ist, daß von den mikroskopisch kleinen Protozoen nur selten derartige große Mengen vorhanden sind, daß sie genügen, um eine makrochemische Untersuchung auszuführen.

In dieser Beziehung ist *Noctiluca* außerordentlich günstig, da sich diese Planktonorganismen zu gewissen Zeiten in sehr großen Mengen an

der Meeresoberfläche ansammeln. Eine makrochemische Analyse der Eiweißsubstanzen der *Noctiluca* hat Emmerling (1909) bereits ausgeführt, ohne aber die Fettsubstanzen näher zu bestimmen. Schon unsere mikroskopischen Untersuchungen ließen einen ziemlich hohen Fettgehalt vermuten, wie er sich dann durch die Extraktion auch herausgestellt hat.

Zur Bestimmung des Fettes benutzte ich die einfache Ätherextraktionsmethode im Soxhletapparat, wie sie in der Technik allgemein Verwendung findet. Im Nachfolgenden werde ich im großen und ganzen den Gang der Analyse schildern, über nähere technische Einzelheiten der Fettbestimmung und ihrer Kennzahlen möge man in den technischen Handbüchern nachlesen; eine brauchbare praktische Anleitung gibt u. a. R ö h m a n n in A b d e r h a l d e n s Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden (1910) und B r a u n (1920) in dem kleinen Bändchen der „Sammlung Göschen“.

Während eines kürzeren Aufenthaltes an der Biologischen Anstalt auf Helgoland bekam ich *Noctiluca* in größeren Mengen, welche dort bei bestimmten Wasser- und Windverhältnissen in einer dicken Schicht im Hafen zusammengetrieben werden. Von diesen an der Wasseroberfläche treibenden Noctiluken wurde das Material geschöpft und in zwei Glashäfen gefüllt. In diesen Gläsern sammelten sich die Noctiluken vermöge ihres geringen spezifischen Gewichtes an der Wasseroberfläche an und bildeten dort eine ungefähr 25 cm dicke Schicht, unter welcher sich nur sehr wenig Wasser befand. Dieses wenige Wasser wurde mittels eines Saughebers nach Möglichkeit entfernt. Die Tiere waren in der größten Mehrzahl vollständig frisch, lebend; wenn sie abgestorben sind, sinken sie auch zu Boden. Das in dem Material noch vorhandene Wasser versuchte ich dann durch Abfiltrieren zu entfernen. Das Abnutzen mittels Saugpumpe ging nur sehr langsam, da sich die Poren des Filters sofort verstopften. Etwas besser ging das Filtrieren mit einem einfachen Filter in einem großen Trichter, ohne Absaugen.

Es wurde 1‰ Formaldehyd zugesetzt, um eine Bakterienentwicklung auf dem Material zu vermeiden, die sonst immer sehr leicht und sehr schnell eintritt. Die meisten der sonst üblichen Desinfektionsmittel, wie z. B. Toluol, Chloroform usw. waren in unserem Falle dazu ungeeignet, weil sie gleichzeitig auch Fettlösungsmittel darstellen; es konnte durch sie also Fett gelöst und die quantitative Fettbestimmung dadurch gefährdet werden. Deshalb nahm ich eine möglichst schwache Formaldehydlösung, da ja auch sonst Formalin gerade dann als Fixierungsmittel für tierische Objekte angewandt wird, wenn es galt, mikroskopische qualitative Fettuntersuchungen mit Hilfe der bekannten Färbemethoden oder mittels polarisierten Lichtes anzustellen. Hierdurch wurde eine Zersetzung des Materials vermieden. Nach ungefähr einwöchentlichem Filtrieren war das Material auf knapp die Hälfte seines ursprünglichen Volumens eingeengt. Da ich nunmehr die Insel verlassen wollte, füllte ich das Material, welches jetzt einen dickflüssigen Brei

darstellte, in eine Flasche von 1 Liter Inhalt, um es darin nach Breslau zu transportieren.

Hier in Breslau wurde die Untersuchung fortgesetzt, und zwar hauptsächlich in der physiologisch-chemischen Abteilung des Physiologischen Institutes. Herrn Prof. Schmitz möchte ich auch an dieser Stelle meinen aufrichtigsten Dank aussprechen für die große Liebenswürdigkeit, mit der er mir die Einrichtungen seiner Abteilung für meine Arbeiten zur Verfügung gestellt hat, und für die mannigfachen Hilfen und Ratschläge, mit denen er mich während der ganzen Untersuchung jederzeit unterstützt hat.

Auch durch längeres Stehen trennten sich die Noctiluken, die, da sie ja jetzt tot waren, sich langsam zu Boden setzten, kaum von der noch vorhandenen Flüssigkeit. Um dieses Wasser weiter zu entfernen, versuchte ich, das Material zu zentrifugieren. Wegen des geringen spezifischen Gewichtes der Noctiluken war auch dieses mit einigen Schwierigkeiten verbunden; doch gelang es mir mit dieser Methode, das Material weiter auf die Hälfte seines Volumens einzuengen. Den nun noch vorhandenen Rest filtrierte ich durch gehärtete Filter, auf denen die Noctiluken nach zwei Tagen einen sehr dicken Brei bildeten.

Darauf wurde der Filtrerrückstand mit destilliertem Wasser ausgewaschen, um das in dem Material etwa noch befindliche Salz des Meerwassers auszuwaschen. Nachdem das Wasser nach weiteren drei Tagen ziemlich vollständig durchfiltriert war, brachte ich die Filter mit dem auf ihnen befindlichen dicken Brei von Noctiluken in einen Thermostaten von etwa 40—50° C. Am nächsten Tage waren die Filter vollständig getrocknet. Nun gelang es leicht, die Noctiluken von den gehärteten Filtern abzukratzen. Meist löste sich das Material in einer dünnen, zusammenhängenden Schicht oder in kleineren Fetzen leicht vom Filter los. Das abgelöste Material wurde zerkleinert. Das Gewicht der Trockensubstanz betrug: 1,50 g.

Da es ja nicht möglich ist, das genaue ursprüngliche Volumen und Gewicht der lebenden Tiere zu bestimmen, weil man unmöglich das außen an ihnen haftende Wasser entfernen kann, ohne die Organisation und damit auch das Volumen der einzelnen Tiere zu schädigen, ist es leider unmöglich, eine bestimmte Angabe über den Wassergehalt der Tiere zu machen. Wenn man jedoch bedenkt, daß die Noctiluken im lebenden Zustande, nachdem sie sich vollständig an der Wasseroberfläche angesammelt hatten, in zwei Glashäfen eine Schicht von ungefähr 25 cm Dicke bildeten und ungefähr einen Raum von drei Litern einnahmen, und daß sie selbst nach den mannigfachen Prozeduren bis zum Transport, durch die sicher viele Tiere geplatzt und dadurch ein großer Teil des Wassers der in ihnen enthaltenen Zellflüssigkeit mit entfernt war, noch über 1 Liter Volumen besaßen, so kann man daraus ersehen, daß der Wassergehalt der Noctiluken ganz außerordentlich groß ist.

Um nunmehr den Gesamt-Fettgehalt des vorliegenden Trockenmaterials zu bestimmen, wurde die fein zerkleinerte Substanz in eine

Hülse von Fließpapier gebracht und in den Extraktionsapparat eingeführt. Zur Extraktion diente der Soxhletapparat, welcher eine Dauerextraktion ermöglicht. Der Apparat wurde auf den Extraktions-Erlenmeyerkolben aufgesetzt und seinerseits mit einem senkrecht stehenden Kühler versehen. Die Extraktion geschah mit Äthyläther (Aether sulfur. puriss. pro Narcosi). Der Extraktionskolben wurde auf einem Wasserbade erwärmt; hierdurch verdampft der Äther, wird im Kühler wieder verflüssigt und tropft dann auf die zu extrahierende Masse. Hier bleibt der Äther so lange im Soxhletapparat, bis er den höchsten Stand der Hebevorrichtung erreicht hat, welche nunmehr in Tätigkeit tritt und den fetthaltigen Äther in den Extraktionskolben zurückhebert, worauf der Vorgang von neuem beginnt. Der erst abfließende Äther ist deutlich grünlich-gelb gefärbt. Die Extraktion wurde einen Tag lang (12 Stunden) durchgeführt. Der nun abfließende Äther hat ein klares, helles Aussehen.

Der ätherische Extrakt wurde auf dem Wasserbade erwärmt und der Äther mittels eines absteigenden Kühlers abdestilliert. Die Trockensubstanz im Soxhletapparat wurde noch einmal mit frischem Äther 6 Stunden lang extrahiert, um festzustellen, ob nicht etwa doch noch ätherlösliche Bestandteile darin zurückgeblieben seien. Auch von diesem Extrakt wurde dann der Äther abdestilliert. Beide Gläschen wurden im Trockenschrank bei 50—60° C. 10 Stunden lang getrocknet und nach dem Erkalten gewogen. Von beiden Erlenmeyerkölbchen war das Gewicht des Glases vorher genau festgestellt. In dem Glase mit dem zweiten Extrakt waren nur ganz geringe Spuren von ätherlöslichen Bestandteilen zu sehen, welche ein Gewicht von 0,002 g besaßen. Man kann also sagen, daß fast die ganze Menge der ätherlöslichen Bestandteile bereits durch die erste Extraktion ausgezogen war. Der Erlenmeyerkolben mit dem ersten Extrakt ergab eine Gewichtszunahme von 0,180 g. In 1,50 g Trockensubstanz waren also 0,180 g ätherlösliche Bestandteile enthalten; mit anderen Worten:

Der Gesamtfettgehalt von *Noctiluca* betrug 12 % der Trockensubstanz.

Ich möchte noch bemerken, daß man unter „Gesamtfettgehalt“ die gesamten Mengen der vorhandenen ätherlöslichen Bestandteile versteht, welche neben den Neutralfetten auch freie Fettsäuren, Cholesterinester, Cholesterin, einige Phosphatide usw. enthalten. Daß das Cholesterin sogar einen nicht unbeträchtlichen Prozentsatz ausmacht, wird sich im weiteren Verlauf der Analyse noch des Näheren zeigen.

Der Rückstand des ätherischen Extraktes hatte eine grünlich-braune Farbe und einen eigentümlichen Geruch. Die Substanz besitzt in der Kälte eine weichfeste Beschaffenheit und wird schon bei gelindem Erwärmen flüssig.

Diese Fettsubstanzen werden in 20 ccm absolutem Alkohol gelöst, dessen geringer Säuregehalt vorher genau titrimetrisch bestimmt war. In dem kalten Alkohol lösen sich die Fettsubstanzen nur sehr langsam

auf, nach einem gelinden Erwärmen auf dem Wasserbade erfolgt die Lösung aber sehr rasch und die Substanzen bleiben auch nach dem Erkalten des Alkohols in Lösung.

Als erste Kennzahl wird die „Säurezahl“ bestimmt, welche diejenige Menge Kaliumhydroxyd in Milligrammen angibt, welche nötig ist, um die in 1 g Fettsubstanz vorhandenen freien Fettsäuren zu neutralisieren, sie gibt uns also ein Maß für den Gehalt an freien Fettsäuren.

Zu der alkoholischen Lösung unserer Fettsubstanzen wurden einige Tropfen Phenolphthaleinlösung als Indikator hinzugesetzt und dann vermittels einer $\frac{1}{50}$ Normalkalilauge-Lösung in der bekannten Weise titriert. Um eine möglichst große Genauigkeit bei diesem Titrieren zu erzielen, wurde die sogen. „Bang-Bürette“ verwendet, welche noch Ablesungen bis zu $\frac{1}{100}$ ccm gestattet. Um aus der Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter die Menge des KOH in Milligramm zu berechnen, mußte diese Zahl (nachdem die geringe im Alkohol vorhanden gewesene Säuremenge abgezogen war), welche 12,16 betrug, mit 1,12 ($= \frac{56}{50}$) multipliziert

werden, da es sich um $\frac{n}{50}$ Kalilauge gehandelt hatte:

$$12,16 \cdot 1,12 = 13,62 \text{ (mg KOH).}$$

Diese Zahl mußte dann noch durch 0,18, die Menge der angewandten Substanz, dividiert werden, um die Umrechnung auf ein Gramm vorzunehmen:

$$13,62 : 0,18 = 75,67 \text{ (Säurezahl).}$$

Die Säurezahl ist keine konstante Größe, sondern schwankt auch innerhalb der einzelnen Fette. Jedoch ist sie bei der Mehrzahl der Fette sehr niedrig und beträgt nur bis höchstens 20. Im Verhältnis hierzu muß man also die von uns gefundene Säurezahl als relativ hoch bezeichnen. Sie deutet wahrscheinlich auf einen großen Bestand an freien Fettsäuren hin, die sich vielleicht durch allmähliche Umsetzungen gebildet haben. Es wäre auch nicht ausgeschlossen, daß das zur Desinfektion benutzte Formaldehyd die Ursache der höheren Säurezahl gebildet hat, bzw. die Anwesenheit von Ameisensäure beteiligt ist.

Um diese Frage nach Möglichkeit zu entscheiden, habe ich später nach der Verseifung und der Entfernung der Fettsäuren in der zurückbleibenden Flüssigkeit und im Waschwasser die Ameisensäurebestimmung durchgeführt und zwar nach der Riesserschen Methode (1916), bei der aus Quecksilberchlorid durch die Ameisensäure Kalomel gebildet wird, welches dann vermittels der Jodometrie quantitativ bestimmt wird. Es ließen sich jedoch nur sehr geringe Mengen von Ameisensäure nachweisen, welche die Säurezahl nicht wesentlich beeinflußt haben können. Da ich jedoch die Seifenlösung vorher im Vakuum abdestilliert habe, so wäre es möglich, daß die Ameisensäure hierbei mit überdestilliert ist; denn Stepp und Zumbusch (1920) haben nachgewiesen, daß bei vermindertem Druck Ameisensäure sogar quantitativ überdestillieren kann. Das Destillat war später, als ich diese Korrektionsbestimmungen

ausführte, leider nicht mehr vorhanden, so daß ich nicht auch in ihm die Ameisensäurebestimmung vornehmen konnte. Jedoch war die Seifenlösung nicht im sauren, sondern im schwach alkalischen Zustande, wodurch etwa vorhanden gewesene Ameisensäure gebunden gewesen wäre. Es ist also das Vorhandensein größerer Mengen von Ameisensäure nicht sehr wahrscheinlich.

Zu der bei der Säurezahlbestimmung neutralisierten Fettlösung wird nun weiter eine abgemessene Menge Kalilauge zugesetzt, um eine vollständige Verseifung sämtlicher vorhandener Ester durchzuführen und die Ester- und Köttsdorfersche Verseifungszahl zu bestimmen. Da zur Rücktitration $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure benutzt wurde, will ich hier alle Maßangaben zur einfacheren Berechnung in $\frac{n}{10}$ Lösungen angeben.

Die mit alkoholischer Kalilauge versetzte alkoholische Fettlösung wurde auf dem Wasserbade ungefähr $\frac{3}{4}$ Stunden lang erwärmt, wobei der benutzte Erlenmeyerkolben durch einen Trichter verschlossen war, um das Entweichen von Alkohol möglichst zu verhüten. Bereits von der Titration der Säurezahl her befand sich in dieser Lösung ein geringer Phenolphthaleinzusatz, welcher die Lösung rot färbte. Das noch warme Gemisch titrierte ich mit $\frac{1}{10}$ n Schwefelsäure bis zur Entfärbung, wodurch das überschüssige, nicht zur Verseifung verbrauchte Kaliumhydroxyd wieder neutralisiert wurde.

Die erhaltene Anzahl Kubikzentimeter ergab umgerechnet eine Verseifungszahl von 131. Diese relativ niedrige Zahl, sowie die Überlegung, daß in so verdünnten Lösungen wie der unsrigen die Verseifung nur sehr schlecht und unvollständig vor sich geht, veranlaßte mich, die Verseifung durch abermaligen Zusatz von KOH, Stehenlassen über Nacht und längeres Kochen auf dem Wasserbade mit nachfolgender Neutralisation der überschüssigen KOH noch dreimal durchzuführen, bis sich endlich eine Konstanz des erhaltenen Wertes ergab. Die Verseifung war also tatsächlich das erste Mal nicht vollständig vor sich gegangen.

Die Analyse und Berechnung ergab im einzelnen folgende Werte:

Vorgelegt	19,6 ccm $\frac{n}{10}$ KOH.
Zurücktitriert	17,8 " " "
Gebunden	1,8 " " "
2. Mal vorgelegt	9,8 " " "
Zusammen	11,6 " " "
Zurücktitriert	8,7 " " "
Zusammen gebunden	2,9 " " "
3. Mal vorgelegt	10,8 " " "
Zusammen	13,7 " " "
Zurücktitriert	7,7 " " "
Zusammen gebunden	6,0 " " "
4. Mal vorgelegt	13,0 " " "
Zusammen	19,0 " " "
Zurücktitriert	13,0 " " "
Zusammen gebunden	6,0 " " "

Im ganzen sind also 6,0 ccm $n/_{10}$ KOH gebunden; da 1 ccm $n/_{10}$ KOH 5,6 mg KOH enthält, so sind also $6,0 \cdot 5,6 = 33,6$ mg KOH gebunden worden. Diese Zahl, durch Division durch die Menge der angewandten Substanz (0,18 g) auf 1 g Substanz umgerechnet, ergibt die Esterzahl, welche die Menge Kaliumhydroxyd in Milligrammen angibt, welche nötig ist, um die vorhandenen Ester zu verseifen.

$$33,6 : 0,18 = 187 \text{ (Esterzahl).}$$

Will man hieraus die Köttsdorfersche Verseifungszahl berechnen, welche die Menge Kaliumhydroxyd in Milligrammen angibt, welche nötig ist, um die in 1 g Substanz enthaltenen freien Säuren zu neutralisieren und die Ester zu verseifen, so muß man die erhaltenen Ester- und Säurezahlen addieren:

Esterzahl	187
Säurezahl	75
Verseifungszahl	262

Nach der Bestimmung dieser drei für die Fette wichtigen Kennzahlen erschien es mir besonders erforderlich, auch den Gehalt an Cholesterin festzustellen, besonders weil Emmerling (1909) bei der Bestimmung der Eiweißsubstanzen die Angabe gemacht hatte, daß der ätherische Extrakt „die Reaktionen des Cholesterins“ gezeigt hätte und weil im übrigen meine mikroskopische Untersuchung (1921) gerade über das Vorhandensein von Cholesterin keine vollständige, einwandfreie Klarheit hatte geben können.

Das Cholesterin bildet die Hauptmasse des sogen. „Unverseifbaren“, der Substanzen, welche durch Kaliumhydroxyd nicht mit verseift werden. Es war also nötig, in unserem vorliegenden Gemisch das „Unverseifbare“ von der Seifenlösung zu trennen. Dies geschah mit der sogen. Syndikatsmethode. Zunächst wurde der Alkohol sowie die Hauptmenge des Wassers bei niedriger Temperatur im Vakuum abdestilliert. Der im Kolben zurückbleibende Rückstand wurde mit etwa 25 ccm warmen destillierten Wassers aufgenommen und nach dem Erkalten im Scheidetrichter mit Äthyläther ausgeschüttelt. Das Ausschütteln wurde dreimal mit frischem Äther wiederholt. Anfänglich bildete sich eine Emulsion, die sich nur langsam wieder trennte.

Der ätherische Extrakt wurde dann dreimal mit reinem destillierten Wasser ausgewaschen, wobei das Waschwasser zuletzt ganz klar und rein blieb. Das Waschwasser wurde zu der Seifenlösung getan. Die ätherische Lösung wurde filtriert, der Äther auf dem Wasserbade abdestilliert und der Rückstand im Trockenschrank getrocknet.

Das Gewicht dieses „Unverseifbaren“ betrug: 0,062 g = 34,4 % des Gesamtfettgehaltes und 4,13 % der Trockensubstanz.

Das erhaltene „Unverseifbare“ wurde zunächst noch einer weiteren Reinigung unterworfen, durch Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure, neutralem Auswaschen, um etwa noch vorhandene geringe Seifenreste zu entfernen, und Filtrieren, wonach noch 0,051 g „Unverseifbares“

zurückblieben. Um zu entscheiden, wie weit in dieser Gesamtmenge des „Unverseifbaren“ reines Cholesterin enthalten sei, hielt ich es für angezeigt, eine möglichst genaue quantitative Cholesterinbestimmung vorzunehmen, und zwar nach der guten und vielfach erprobten Methode von Windaus (1910) mit Hilfe des Digitonin, welches mit dem freien Cholesterin eine schwerlösliche Verbindung bildet und einen fein kristallinen Niederschlag liefert.

Herr Privatdozent Dr. F. Rosenthal war so liebenswürdig, diese Bestimmung für mich auszuführen, mit seinem jetzt so kostbarem und kaum erhältlichen Digitonin. Ich möchte ihm auch an dieser Stelle für sein Entgegenkommen meinen Dank aussprechen. Er fand, daß in dem 0,051 g „Unverseifbaren“ 0,0124 g Cholesterin enthalten waren.

Der Cholesteringehalt betrug also:

24,3 % des „Unverseifbaren“ oder
6,9 % des Gesamtfettgehaltes oder
0,8 % der Trockensubstanz.

Nachdem das „Unverseifbare“, wie oben beschrieben, von der Seifenlösung getrennt war, wurde diese zusammen mit dem Waschwasser, mit dem die ätherische Lösung des „Unverseifbaren“ mehrmals ausgewaschen war, im Vakuum gelinde erwärmt und ein Teil des Wassers abdestilliert und die außerordentlich stark verdünnte Lösung auf ungefähr ein Drittel ihres Volumens eingengt. Darauf wurde die Seifenlösung in einem Scheidetrichter mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure versetzt bis Kongopapier gebläut wurde. Hierdurch wurden die Seifen wieder zersetzt und die Fettsäuren freigemacht. Die wasserunlöslichen Fettsäuren fielen aus und sammelten sich an der Oberfläche der wässrigen Lösung an.

Dieses Gemisch wurde viermal mit je 3 ccm Chloroform ausgeschüttelt, in welchem sich die Fettsäuren lösen. Es entstand eine klare, gelblich-braungefärbte Chloroformlösung, welche sich aber nach einem Tage, wahrscheinlich infolge geringer Wasserbeimengungen, leicht trübte. Da aber eine solche Trübung keinerlei Einfluß auf die Bestimmung der Jodzahl hat, welche zum Schluß noch ausgeführt werden sollte, wurde diese leichte Trübung nicht weiter berücksichtigt.

Die Bestimmung der Jodzahl wurde nach der von Hübl angegebenen Methode durchgeführt. Die Hüblsche Jodlösung wurde in der üblichen Weise hergestellt (5 g Jod in 100 ccm 95 prozent. Alkohol + 6 g Quecksilberchlorid in 100 ccm 95 prozent. Alkohol) und die Lösung vor dem Gebrauch zwei Tage stehen gelassen. In ihr bildet sich neben verschiedenen anderen Stoffen vor allem das Chlorjod, dessen Jod, durch Jodkalium wieder freigemacht, addierend und substituierend auf die ungesättigten Fettsäuren einwirkt. 25 ccm der Hüblschen Jodlösung wurde zu der Chloroformlösung getan, die Meßpipette dreimal mit etwas Alkohol nachgespült, welcher dann ebenfalls zur Lösung gegossen wurde. Diese Mischung wurde dann einen halben Tag im

Dunklen stehen gelassen, darauf wurden 15 ccm einer 10 prozent. Jodkaliumlösung zugesetzt. Es bildete sich ein roter Niederschlag von Quecksilberjodid, welcher sich jedoch bald wieder löste. Dann ließ ich $\frac{1}{10}$ Normal-Natriumthiosulfatlösung aus einer Bürette zufließen, bis die Jodlösung nur noch schwach gelb gefärbt war. Nun wurden einige Tropfen Stärkelösung als Indikator zugesetzt. Die Lösung färbte sich sofort blauschwarz. Unter dauerndem starken Schütteln wurde vorsichtig weiter Natriumthiosulfatlösung tropfenweise zugesetzt und bis zur Entfärbung titriert. Der Umschlag ist deutlich und scharf zu erkennen. Es wurden 25,6 ccm $\frac{1}{10}$ n Natriumthiosulfatlösung verbraucht.

Um den Gehalt der Jodquecksilberlösung zu bestimmen, wurden zwei weitere Titrationsen ausgeführt. Einmal wurde genau wie oben 25 ccm der Hübischen Lösung genommen, jedoch mit 12 ccm reinem Chloroform versetzt und die Mischung die gleiche Zeit im Dunklen stehen gelassen; dann 10 ccm der 10 prozent. Jodkaliumlösung zugesetzt und wieder mit Natriumthiosulfatlösung titriert. Es wurden 26,9 ccm verbraucht. Die zweite Titration wurde genau in der gleichen Weise ausgeführt, jedoch ohne daß die Hübische Jodlösung-Chloroformmischung längere Zeit im Dunklen gestanden hatte. Hierbei wurden 26,85 ccm verbraucht. Die beiden erhaltenen Titer stimmen also sehr gut überein. Die Berechnung gestaltet sich folgendermaßen:

1 ccm $\frac{1}{10}$ Natriumthiosulfatlösung entspricht 0,0127 g Jod.

25 ccm Hübische Jodlösung entsprechen	26,9	
Vorgelegt: 25 ccm Hübl-Lösung	= 26,9	„
Zurücktitriert	25,6	„
	<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/>	„
Gebunden	1,3	„

Diese 1,3 ccm $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ entsprechen $1,3 \cdot 0,0127 = 0,0165$ Jod. Diese Zahl ist durch die Menge der angewandten Substanz (0,18 g) zu dividieren und mit 100 zu multiplizieren, da sich die Hübische Jodzahl auf 100 Teile Substanz bezieht. $\frac{0,0165 \cdot 100}{0,18} = 9,2$.

Es ist jedoch zu beachten, daß wir vorher das „Unverseifbare“ entfernt hatten, daß also die angewandte Fettsubstanz nur 0,18—0,062 = 0,118 g betragen hat, was eine Jodzahl von 14 ergeben würde.

Nun vermag aber das „Unverseifbare“, das zum Teil aus Cholesterin besteht, ebenfalls Jod und zwar sogar in ziemlich erheblichem Maße zu binden. Die Jodzahl des reinen Cholesterins beträgt 68. Da in unserem Falle 34,4 % des Gesamtfettgehaltes aus „Unverseifbarem“ bestanden haben, so müßten wir $\frac{68 \cdot 34,4}{100} = 23,4$ hinzuaddieren: $9,2 + 23,4 = 32,6$, wenn das „Unverseifbare“ nur aus reinem Cholesterin bestünde. Tatsächlich sind aber nur 24,3 % des „Unverseifbaren“ reines Cholesterin, während das Übrige andere Substanzen sein müssen, vielleicht Phosphatide, pflanzliches Phytosterin, geringe Seifenreste usw. Würden diese

Substanzen gar kein Jod zu binden imstande sein, sondern lediglich die 24,3 % Cholesterin, so hätten wir nur 24,3 % von 23,4 zu addieren, also 5,68; $9,2 + 5,68 = 14,88$. Wahrscheinlich werden aber auch die übrigen Substanzen des „Unverseifbaren“ Jod zu binden imstande und die Jodzahl entsprechend höher sein. Sie wird in unserem Falle zwischen 15 und 33 betragen. Das ist die sogen. Hüblsche Jodzahl, welche angibt, wieviel Jod 100 Teile Fett bzw. Fettsäuren zu addieren vermögen. Diese Jodzahl, welche uns einen Maßstab für den Gehalt an ungesättigten Verbindungen gibt, ist für die einzelnen Fettarten im allgemeinen charakteristisch. Sie ist in unserem Falle ziemlich niedrig.

Im Anschluß an die Untersuchung der ätherlöslichen Substanzen habe ich noch einen alkoholischen Extrakt aus der vorher mit Äther ausgezogenen Trockensubstanz hergestellt, um ihn auf Phosphatide zu untersuchen. Hierbei habe ich mich jedoch auf eine qualitative Untersuchung beschränkt, da eine quantitative doch keine genauen Werte geliefert hätte; denn ein Teil der Phosphatide löst sich bereits im Äther. An dem ätherischen Extrakt konnte ich aber die Phosphatid-Untersuchung nicht auch noch quantitativ durchführen, nachdem alle die vorhergehenden Bestimmungen bereits damit ausgeführt waren und mir neues Ausgangsmaterial nicht mehr zur Verfügung stand. Der alkoholische Extrakt wurde in der Weise gewonnen, daß die früher mit Äther ausgezogene Trockensubstanz 8 Stunden lang in 96 prozent. Alkohol auf dem Wasserbade erwärmt und dann der Alkohol abfiltriert wurde. Die alkoholische Lösung hatte eine schöne goldgelbe Farbe angenommen, was wohl auf das Vorhandensein von Lipochromen zurückzuführen ist. Ein Teil des Alkohols wurde abdestilliert und so die Lösung etwas eingengt. Durch weiteres Erwärmen wird der Alkohol möglichst entfernt und dann die in der Lösung enthaltenen organischen Substanzen nach dem Neumannschen Verfahren durch Kochen mit konzentrierter Schwefel- und Salpetersäure zerstört und die in den Substanzen etwa enthaltene Phosphorsäure aufgeschlossen. Nach Zusatz von Wasser, Ammoniumnitratlösung und Erwärmen wurde Ammoniummolybdat hinzugetan. Es bildete sich allmählich ein feiner gelber Niederschlag von phosphormolybdänsäurem Ammoniak. Die Phosphorsäurereaktion ist also positiv ausgefallen; in dem alkoholischen Extrakt waren Phosphatide enthalten.

Stellen wir die erhaltenen Werte noch einmal zusammen:

Trockensubstanz von über 1 L. Organismen	= 1,5 g
Gesamtfettgehalt	= 12% der Trockensubstanz,
Säurezahl	= 75,
Esterzahl	= 187,
Verseifungszahl	= 262,
Jodzahl	= ca. 15–33,
„Unverseifbares“	= 34,4% des Gesamtfettgehaltes,
	= 4,13% der Trockensubstanz,

Cholesterin	= 24,3% des „Unverseifbaren“,
	= 6,9% des Gesamtfettgehaltes,
	= 0,8% der Trockensubstanz,

Phosphorsäurereaktion

des Alkoholextraktes = + (nur qualitativ).

Bei der Beurteilung dieser Zahlen muß man berücksichtigen, daß, obwohl es sich für Protozoen schon um sehr erhebliche Mengen Material handelte, die angewandte Substanz doch immer noch relativ klein gewesen ist im Verhältnis zu den Mengen, an denen man sonst derartige Bestimmungen auszuführen pflegt (0,18 g Fettsubstanz statt 1—5 g). Ferner waren wir gezwungen, sämtliche Zahlen an der gleichen Substanz nacheinander zu bestimmen, da uns kein weiteres Material mehr zur Verfügung stand und durch eine Teilung der vorhandenen Substanz die Mengen gar zu klein geworden und die Fehler bedeutend vergrößert worden wären. Sonst pflegt man bei der Bestimmung jeder Kennzahl von neuem Fettmaterial auszugehen. Dadurch, daß alle die verschiedenen nötigen Manipulationen an der gleichen geringen Substanzmenge ausgeführt werden mußten, sind sicher die Fehlergrenzen erheblich erhöht worden, besonders für die zuletzt gewonnenen Werte. Es wurden selbstverständlich sämtliche Operationen mit peinlichster Genauigkeit quantitativ ausgeführt. Um allgemein gültige Werte zu erhalten, hätte man eigentlich auch eine größere Anzahl von Bestimmungen ausführen und das Mittel daraus ziehen müssen. Aber auch dieses verboten die geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen.

Betrachten wir die erhaltenen Werte noch einmal kritisch: Der stark vakuolige Bau der *Noctiluca* und ihre großen Mengen von Zellsaft ließen von vornherein einen sehr hohen Wassergehalt vermuten, was dann auch in der geringen Menge der erhaltenen Trockensubstanz zum Ausdruck kommt. Der Gesamtfettgehalt dieser Trockensubstanz ist dagegen recht beträchtlich, beträgt er doch 12%. Auch hierfür gab uns die vorherige mikroskopische Untersuchung die nötigen Anhaltspunkte.

Die erhaltene Säurezahl (75) ist relativ sehr hoch und wahrscheinlich auf sekundäre Veränderungen oder Beimengungen zurückzuführen. Die Esterzahl (187) gibt einen schönen Wert, wie wir ihn bei einer sehr großen Anzahl von Fetten finden. Die Verseifungszahl (262) ist dagegen ziemlich hoch, obwohl Werte in ähnlicher Höhe auch bei einer ganzen Reihe von anderen Fetten beobachtet worden sind. Außerdem ist diese hohe Zahl auch durch die übermäßig hohe Säurezahl entstanden und würde eventuell etwas zu reduzieren sein.

Die Jodzahl (15—33) ist im Gegensatz hierzu sehr niedrig, doch sind ähnlich niedrige Zahlen auch bei den Fetten höherer Tierarten (z. B. bei Hirschen, Rehen und Gemsen) festgestellt worden. Bei der Beurteilung der Jodzahl des Fettes der *Noctiluca* muß man noch in Erinnerung behalten, daß es sich um die zuletzt gewonnene Zahl handelt,

daß also durch die mannigfachen Manipulationen geringe Substanzverluste eingetreten und so die Fehlerquellen hier am größten sind, daß die Zahl in Wirklichkeit vielleicht etwas höher ist. Relativ niedrige Jodzahlen hat auch Rosenfeld (1902) bei Diatomeen gefunden (61,8—64,15). Da nun gerade die Diatomeen einen Hauptbestandteil der Nahrung der Noctiluken bilden, so läßt sich hier vielleicht eine gewisse Beziehung zwischen den Jodzahlen des Fettes der Nahrung und des Verzehrers feststellen, in ähnlicher Weise wie es Rosenfeld bei einigen höheren Meerestieren nachgewiesen hat.

Die Menge des „Unverseifbaren“ ist nicht unbedeutend (34,4 % des Gesamtfettgehaltes) und auch der Cholesteringehalt (6,9 % des Gesamtfettes) ist als beträchtlich zu bezeichnen. Dieser Gehalt an Cholesterin erklärt deutlich, daß Emmerling (1909) im ätherischen Extrakt „eine salbenartige Masse mit den Reaktionen des Cholesterins“ erhielt. Andererseits besteht aber doch die Hauptmenge der in der Zelle vorhandenen fettartigen Substanzen aus echten Fetten, sodaß es wohl verständlich ist, daß mikroskopisch der Nachweis des Cholesterins nicht gelingen wollte.

Der relativ hohe Cholesteringehalt ist besonders interessant bei der großen Bedeutung, welche neuerdings den Cholesterinverbindungen und den Phosphatiden (Lipoiden) für die Lebensfunktionen der Zelle zugeschrieben werden. Vielleicht stehen diese Stoffe auch in Zusammenhang mit dem Leuchtvermögen. Das Vorhandensein von Phosphatiden konnte durch den positiven Ausfall der Phosphorsäurereaktion im alkoholischen Extrakt nachgewiesen werden.

Neben dem Cholesterin, das 24,3 % des „Unverseifbaren“ ausmacht, müssen noch andere Substanzen in diesem enthalten sein. Dabei kann es sich zum Teil noch um Phytosterin, dem Cholesterin der Pflanzen, gehandelt haben, welches in den pflanzlichen Nahrungskörpern, den Diatomeen, enthalten gewesen sein könnte. Weiter können im „Unverseifbaren“ auch gewisse Phosphatide mit enthalten gewesen sein. Auch geringe Reste von Fettsäuren und Seifen können eine Rolle spielen, welche trotz des mehrmaligen Ausschüttelns nicht mit entfernt worden sind.

• Erst nach Abschluß meiner Untersuchungen kam mir die Arbeit von Rosenfeld (1902) zu Gesicht. Ich ersehe aus ihr, daß Rosenfeld auch bereits eine Bestimmung des Fettes bei *Noctiluca* ausgeführt hat; allerdings hat er nur den Gesamtfettgehalt bestimmt, aber einen sehr viel niedrigeren Wert als ich gefunden: 0,67 % der Trockensubstanz, während meine Extraktion 12 % ergeben hat. Rosenfeld hat eine andere Methode angewendet, die Rosenfeldsche Alkohol-Chloroform-Extraktion, welche jedoch im allgemeinen eher höhere Werte als die Ätherextraktion liefern soll. Rosenfeld hat vor allem aber eine ganz andere Methode der Gewinnung der Trockensubstanz angewendet, er hat die Tiere durch ein Sieb gegossen und dann einfach zur Trockene

eingedampft. Auf diese Weise bekommt man natürlich auch das ganze Salz des umgebenden Meerwassers, welches bekanntlich eine recht beträchtliche Menge Salz enthält, mit in die Trockensubstanz. Daß tatsächlich sehr viel Salz in der Trockensubstanz mit vorhanden gewesen ist, darauf deutet die Bemerkung von Rosenfeld, daß die trockene Substanz sehr stark hygroskopisch gewesen sei. Ferner ist Rosenfeld nur von „lufttrockener“, nicht von „absolut trockener“ Substanz ausgegangen; es wird also auch noch ein gewisser Prozentsatz Wasser im Ausgangsmaterial vorhanden gewesen sein. Auffallend ist auch die relativ große Menge Trockensubstanz (98 g), die Rosenfeld aus 1314 g (?) Organismen erhalten hat. So wird wahrscheinlich der Gehalt an Salzen und an Wasser den relativ kleinen Prozentgehalt Fett bei der Rosenfeldschen Bestimmung erklären. Herr Geheimrat Rosenfeld, mit dem ich persönlich über diesen Unterschied Rücksprache nahm, glaubte ebenfalls, daß wohl so am besten diese Differenzen zu erklären seien. Es ist jedoch auch möglich, daß tatsächlich die Tiere einen verschiedenen Fettgehalt besessen haben, etwa bedingt durch verschiedene Witterungsverhältnisse und Jahreszeit. Rosenfeld hat seine Untersuchungen im Juli, ich in den letzten Tagen des September ausgeführt. Bei der großen Verschiedenheit der angewandten Methodik sind aber wohl irgendwelche Schlüsse in dieser Richtung nicht berechtigt.

Außer dem Gesamtfettgehalt hat Rosenfeld bei *Noctiluca* keinerlei andere Kennzahlen bestimmt. Dagegen hat er, wie bereits oben erwähnt, auch an Diatomeenplankton Fettbestimmungen ausgeführt. Die Jodzahlen haben wir bereits oben verglichen. Der Gesamtfettgehalt der Diatomeen betrug 1,87—7,44 %, meist ungefähr 4 %. Dieser Fettgehalt der Planktondiatomeen gibt uns weiteren Aufschluß über den Ursprung des *Noctiluca*-Fettes, als ihn uns unsere früheren Betrachtungen (1921, p. 39 ff.) bereits gegeben haben, da ja die Diatomeen einen Hauptnahrungsbestandteil der *Noctiluca* bilden.

Neben den Diatomeen werden auch gelegentlich Peridineen in größeren Mengen von *Noctiluca* verzehrt. Auch über deren Fettgehalt liegt eine Bestimmung vor, wenn auch die weiteren Eigenschaften des Peridineenfettes nicht näher untersucht worden sind. J. A. Meyer (1913) hat vorwiegend aus *Ceratium* bestehendes Plankton untersucht und einen Fettgehalt von 2,74 % der Trockensubstanz, bzw. von 3,33 % der seelsalzfreien Trockensubstanz festgestellt. Also auch die Peridineen weisen allerlei Fett auf, das sich auch mikroskopisch nachweisen läßt (vergl. Schütt, 1895). So kommen auch diese neben den als Nahrung aufgenommenen Diatomeen, Crustaceen und Würmern als direkte Lieferanten des Fettes der *Noctiluca* in Betracht.

Diese Fettbestimmungen an Diatomeen sind die einzigen mir bekannten Bestimmungen an Protisten, und die so Vergleichswerte für *Noctiluca* abgeben. Allerdings handelt es sich bei beiden Gruppen um pflanzliche Organismen, welche ihr Fett selbst aufbauen, während es bei

Noctiluca, wenigstens zum größten Teil, wohl aus der aufgenommenen Nahrung stammt. Der gefundene Fettgehalt der *Noctiluca* ist auch erheblich größer als bei Diatomeen und Peridineen.

Breslau, im Januar 1921.

Literatur.

- Abderhaldens (1910) Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Bd. II, p. 199—269. Berlin u. Wien.
- Braun, K. (1920), Die Fette und Öle. 2. neubearb. Aufl. „Sammlung Göschen“. Berlin u. Leipzig.
- Emmerling, O. (1909), Hydrolyse der Meeresleuchtinfusorien der Nordsee. In: Biochem. Zeitschr. Bd. 18.
- Meyer, Joh. Alb. (1913), Beiträge zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung wirbelloser Tiere. (Inaug.-Diss. Kiel.) In: Wissensch. Meeresunters. Abt. Kiel, Bd. 16.
- Pratje, A. (1921), *Noctiluca miliaris* Sur. Beiträge zur Morphologie, Physiologie und Cytologie. I. Morphologie und Physiologie (Beobachtungen an der lebenden Zelle). In: Arch. f. Protistenk. Bd. 42, p. 1—98, auch als nat. Diss. Freiburg i. B.: „*Noctiluca miliaris* Sur. Untersuchungen über das Vorkommen von Fett.“ Druck Breslau 1920.
- Riesser, O. (1916), Beiträge zur Frage der Ameisensäurebildung und Ausscheidung. I. Die Bestimmung der Ameisensäure in reinen Lösungen, sowie im Harn, nebst einem neuen Verfahren zur Titration des Kalomels. In: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 96, p. 355—366.
- Rosenfeld, G. (1902), Studien über das Fett von Meeresorganismen. In: Wissensch. Meeresunters. N.F. Bd. 5, Abt. Helgoland, p. 57—83.
- Schütt, F. (1895), Die Peridineen der Planktonexpedition. In: Ergebn. d. Plankton-Exp. d. Humboldtstiftg. Bd. 4, p. 82—86. Kiel u. Leipzig.
- Stapp, W. u. H. Zumbusch (1920), Studien über den intermediären Kohlehydratstoffwechsel beim Menschen. II. Über das quantitative Verhalten der Ameisensäure im normalen und pathologischen Blut. In: Deutsch. Arch. f. klin. Medizin. Bd. 134, p. 112—118.
- Windaus, A. (1910), Über die quantitative Bestimmung des Cholesterins und der Cholesterinester in einigen normalen und pathologischen Nieren. In: Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 65, p. 110.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Biologisches Zentralblatt](#)

Jahr/Year: 1921

Band/Volume: [41](#)

Autor(en)/Author(s): Pratje Andreas

Artikel/Article: [Makrochemische, quantitative Bestimmung des Fettes und Cholesterins, sowie ihrer Kennzahlen bei Noctiluca miliaris Sur. 433-446](#)