

weitgehende Ähnlichkeit mit dem in der Augenheilkunde viel verwendeten Physostigmin (Eserin). Eserin wird lokal in der Augenheilkunde bei beginnendem und bereits entstandenem Glaucom gegeben, um den intraokularen Druck herabzusetzen. Das an Stelle von Eserin klinisch geprüfte E 600 führte zu so günstigen Resultaten, daß das Präparat E 600 unter dem Namen „Mintacol-Augentropfen“ und „Mintacol solubile“ seit 1948 als pharmazeutisches Präparat im Handel ist.

B. E 605 (Parathion)

Der dem E 600 entsprechende O,O-Diäthyl-thio-phosphorsäure-0,p-nitrophenylester:

CCOP(=S)(OCC)Oc1ccc([N+](=O)[O-])cc1 wurde Mitte 1944 durch Umsetzen des Diäthyl-thio-phosphorsäuremonochlorids mit dem Natriumsalz des p-Nitrophenols hergestellt. Der später unter dem internen Namen „E 605“ bekannt gewordene Ester ist ein gelbes, wasserunlösliches Öl, das bei + 6° krystallin erstarrt. Eine analytische Bestimmungsmethode für E 605 wurde von P. R. Owerell und M. V. Norris ausgearbeitet. Die Hydrolysenkonstante bestimmte J. A. A. Ketelaar. Eine kurze Übersicht über die Entwicklung von E 605 gaben J. K. Eaton und R. G. Davies.

E 605 ist ein wasser- und alkalibeständiges Insektizid. Es vereinigt in sich die Eigenschaften eines Kontakt-, Fraß- und Gasgiftes. Da auch die toxischen Wirkungen gegen Warmblüter günstig liegen (18–20 mg/kg Maus subcutan), wurde bereits 1945 das Hauptgewicht der Arbeit auf die technische Entwicklung des Präparates E 605 gelegt. Die insektiziden Prüfungen führte im Biologischen Institut Leverkusen H. Kükenthal durch. Später erprobte G. Unterstenhöfer unter den Bedingungen der Praxis das Präparat E 605 in Freilandversuchen.

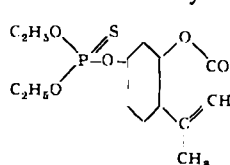
Durch den Umbruch im Jahre 1945 wurden die Ergebnisse mit dem Präparat E 605 dem Auslande bekannt. Chemische Fabriken in USA waren auf Grund der erhaltenen Informationen schneller in der Lage, technische Anlagen zur Gewinnung von

E 605 zu erstellen, als es in der damaligen Zeit in Deutschland möglich war. So erschien E 605 unter dem Namen „Parathion“ eher in USA auf dem Markt als in seinem Ursprungslande Deutschland!

E 605 kommt in seinen insektiziden Wirkungen einem Idealinsektizid nahe. Die insektizide Wirkung ist an die angegebene Konstitution geknüpft. Abwandlungen der Konstitution führen zu keiner Verbesserung.

Entwicklung des Kartoffelkäfermittels E 838 (Potasan)

Als Ergebnis einer systematischen Durchforschung der E 605-Reihe wurde Anfang 1947 vom Verfasser der Thiophosphorsäureester des 4-Methyl-7-oxycumarins synthetisiert:



Der Ester erhielt den internen Namen „E 838“ und kam später unter der Bezeichnung „Potasan“ als spezielles Kartoffelkäferbekämpfungsmittel in den Handel.

Die insektizide Erprobung führte H. Kükenthal im Biologischen Institut in Leverkusen durch. Die Anwendungstechnik wurde in Freilandversuchen von G. Unterstenhöfer bearbeitet. „E 838“ ist ein weißes Krystallpulver vom Fp. 3°.

Während alle bisher hergestellten Insektizide der Phosphorreihe eine breite insektizide Wirkung aufwiesen, zeichnet sich „E 838“ durch eine sehr starke selektive Wirkung aus. Saugende Insekten werden durch „E 838“ nur in untergeordnetem Maße vernichtet, während einige fressende Insekten, wie z. B. der Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata* Say) und die Kartoffelkäferlarven durch „E 838“ in kürzester Zeit sicher getötet werden.

Auch bei „E 838“ führen Änderungen der Konstitution zu keiner wesentlichen Verbesserung der Wirkung.

Die Arbeit über Insektizide auf Basis organischer Phosphorverbindungen wird fortgesetzt. Eingeg. am 9. Juni 1950. [A 283]

Retentionsanalyse von Papierelektropherogrammen natürlicher Proteingemische

Über Retentionsanalyse. III. Mitteilung¹⁾

Von Prof. Dr. TH. WIELAND und LISELOTTE WIRTH

Aus dem Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie

Es wird an Beispielen gezeigt, wie die Retentionsanalyse verbessert und, insbes. auch klinisch, zur quantitativen Bestimmung von Proteinen verwendet werden kann.

Die von Th. Wieland und E. Fischer²⁾ vor 3 Jahren entwickelte Methode der Elektrophorese geladener Molekeln auf einem mit Pufferlösung getränkten Streifen von Filtrierpapier in einer feuchten Kammer ist in der Folgezeit auf verschiedene Körperklassen angewendet worden³⁾. So wurde auch gezeigt, daß Proteine in der angegebenen Apparatur getrennt werden können⁴⁾, deren Nachweis z. B. dadurch gelingt, daß man den Streifen des Pherogramms in der wäßrigen Lösung von diazotierter Sulfanil- oder Metanilsäure und in verd. Soda-Lösung badet, wobei die Proteine als braunrote Flecken sichtbar werden. Man kann auch mit Ninhydrin-Lösung besprühen und danach, am besten in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre, einige Zeit auf 100° erwärmen. Die Papierelektrophorese von Proteinen ist dann von F. Turba und H. J. Enenkel⁵⁾ sowie von H. J. Cremer und A. Tiselius⁶⁾ eingehender studiert worden. Diese Autoren machten die Lage der getrennten Protein-Flecken auf dem Papier durch Anfärben mit Farbstoffen (Azokarmin B, Bromphenolblau und Sublimat) sichtbar und konnten sogar eine quantitative Bestimmung der Komponenten nach Elution der gefärbten Flecken durch Colorimetrie durchführen.

¹⁾ I. Mittlg. Th. Wieland u. E. Fischer, Naturwiss. 35, 29 [1948]. II. Mittlg. Th. Wieland, diese Ztschr. 60, 313 [1948].

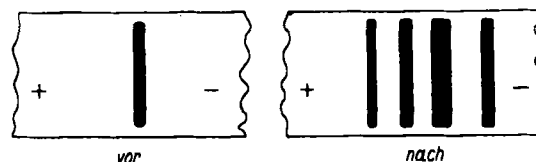
²⁾ Th. Wieland u. E. Fischer, Naturwiss. 35, 29 [1948].

³⁾ Th. Wieland, E. Fischer u. L. Wirth, Liebigs Ann. Chem. 564, 152 [1949] sowie weitere noch unveröff. Ergebnisse.

⁴⁾ Th. Wieland, diese Ztschr. 62, 31 [1950], Vortrag vor der Chem. Ges. Marburg 29. 11. 1949.

⁵⁾ Naturwiss. 37, 93 [1950]. ⁶⁾ Biochem. Z. 320, 273 [1950].

Wir haben nun die Retentionsanalyse zur quantitativen Bestimmung von Proteinen in Elektropherogrammen herangezogen und dabei eine allgem. ausführbare Verbesserung der Retentiometrie ausgearbeitet, über deren Anwendung auf andere Körperklassen im Detail später berichtet werden soll. Die neue Ausführungsform der Analyse besteht darin, daß man das Substanzgemisch nicht, wie früher beschrieben, als kreisförmigen Tropfen auf das Papier aufträgt, sondern als senkrecht zur Stromrichtung angebrachte Linie auf einem 5–10 cm breiten Streifen von Whatman Nr. 1-Papier. Bei der Elektrophorese im beschriebenen Apparat wandern dann die Komponenten als mehr oder weniger breite Streifen in verschiedene Positionen, so daß das fertige Pherogramm diese in gitterartiger Anordnung enthält (Bild 1).



[A 284]

Bild 1

Papierelektrophorese eines streifenförmig aufgetragenen Substanzgemisches

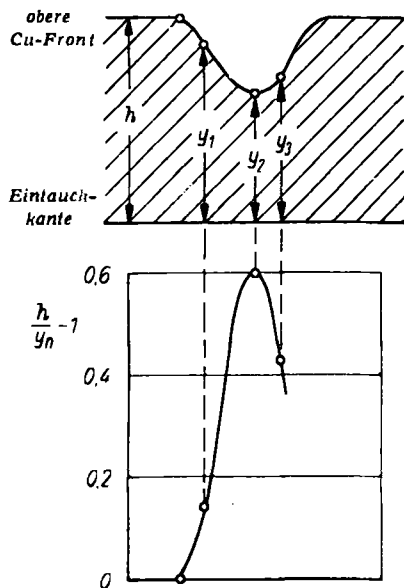
Läßt man nun die bei der Retentiometrie benützte Reagenslösung im Streifen quer zur Stromrichtung aufsickern, so kommt es zur Ausbildung charakteristischer Lücken, weil das Reagens

in den protein-haltigen Säulen langsamer aufsteigt als in den protein-freien Anteilen des Papierstreifens. Dann ist aber der Flächeninhalt der Lücken nicht, wie bei der früher beschriebenen Technik, direkt der Konzentration an Substanz proportional, sondern es muß eine graphische Umformung der Lückenflächen ausgeführt werden, nach einem Modus, welchen Herr Dr.-Ing. F. Marguerre mit uns ausgerechnet hat.

Es sei die Aufnahmefähigkeit des Papiers für das Retentionsreagens (in unserem Falle Cu^{2+}) = α , die des Eiweißes = β . Dann ist die Kriechstrecke der Cu-Ionen im freien Papier = $1/\alpha = h$, die im Papier + Eiweiß = $1/(\alpha + \beta) = y$ (y_1 usw.) (s. Bild 2). Das Verhältnis beider

$$(\alpha + \beta)/\alpha = 1 + \beta/\alpha = h/y \quad (1).$$

Die Konzentration des Eiweißes an jedem Punkt der Lückenkurve ist proportional dem Quotienten β/α , der nach (1) $(h/y)-1$ ist. Man muß also aus der Originalkurve eine solche konstruieren, bei der für jeden Wert y , y_1, \dots der durch Abmessung leicht zu ermittelnde Wert $(h/y)-1$ im beliebigen Maßstab einzutragen ist. Die Verbindung der neuen Punkte ergibt nun verzerrte Kurven, deren Flächenintegrale den Konzentrationen an getrennten Substanzen proportional sind. Man kann sie nach der Umzeichnung auf Millimeterpapier durch Auszählen, Auswägen der ausgeschnittenen Flächen oder am bequemsten durch Planimetrieren ermitteln.



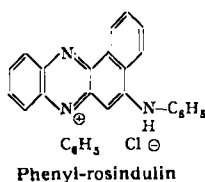
A 284.2

Bild 2. Umzeichnung der Retentionslücken

mit einer Lösung von Azokarmin B⁷⁾ in 50proz. wäßrigem Methanol, das 10% Eisessig enthält, sehr gut eignet. Es werden dabei durch den sauren Farbstoff die Eiweißstoffe als wasserunlösliche Salze ausgefällt, eine Reaktion, welche ihre basischen Gruppen bindet, so daß sie in polyvalente Carbonsäuren verwandelt werden, die mit dem Cu-Reagens Cu-Salze bilden. Man kann diese Fixierung auch durch Pikrinsäure, Trichloressigsäure oder Sulfo-salicylsäure erreichen, doch verbrauchen die so gefällten Proteine unregelmäßige, nicht stöchiometrische Kupfer-Mengen.

Nach dem Fixieren wird das Pherogramm 2 mal in einem Bad desselben Lösungsmittelgemischs ohne Farbstoff gewaschen, kurz an der Luft und darauf 10 min bei 110° getrocknet, zu einem manschettenförmigen Zylinder gerollt und nach weiteren 30 min in die etwa 2–3 mm tiefe Lösung von 100 mg Cu-Acetat (H_2O) in 100 cm³ 7proz. wasserhaltigem Tetrahydrofuran + 5–10 Tropfen Eisessig gestellt. Diese Lösung befindet sich in einer großen Petrischale in einem Exsikkator und steigt nun bis zur oberen

⁷⁾ Azokarmin B ist das saure Na-Salz der Phenyl-rosindulin-trisulfosäure. Der Farbstoff selbst verbraucht bei der Analyse keine Cu-Ionen.



Stellung der Sulfo-Gruppen unbekannt.

Kante auf. Dann wird kurz im Trockenschrank bei 110° getrocknet und mit einer etwa 0,5proz. acetonischen Rubeanwasserstoff-Lösung besprüht. Die Cu-haltigen Bezirke werden dabei als tiefdunkelgraugrüne Flächen sichtbar.

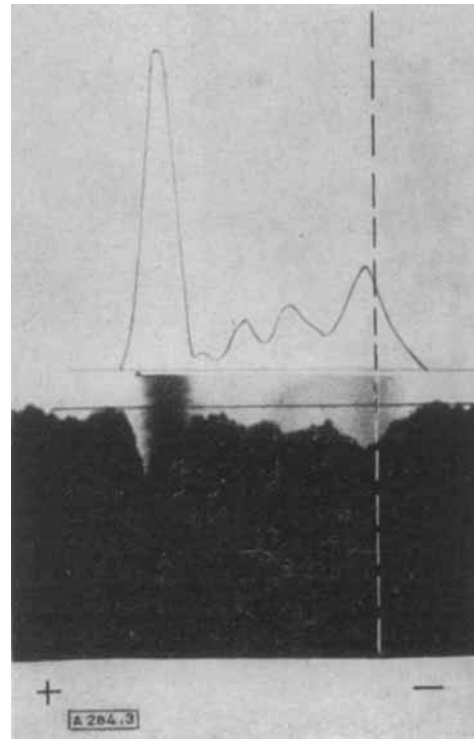


Bild 3

Pherogramm von Normalserum. Ansicht des Originals, darüber: umgezeichnete Konzentrationskurve (s. Text). Die gestrichelte senkrechte Linie stellt wie in den anderen Bildern die Startposition des Proteingemisches dar

Bild 3 zeigt unten das auf diese Weise sichtbar gemachte Retentiogramm einer Elektrophorese von normalem menschlichem Serum, darüber die durch die oben geschilderte Umrechnung erhaltene wahre Konzentrationskurve desselben Eiweißgemischs. Dieses war vorher als Streifen aus einer Kapillarpipette auf das trockene, 8–10 cm breite Papierband gebracht worden (i. g. etwa 0.1 cm³). Dann wurde mit 0,05 m Borat-KCl-Puffer vom p_H 8,6 besprüht und in der angegebenen Kammer 12–15 h bei einer Klemmenspannung von 110 V (etwa 60 V Spannung von Schale zu Schale) unter Verwendung desselben Puffers elektrophoriert. Nach dem Trocknen, Fixieren, Waschen und Retentiometrieren ergaben sich deutlich die Lücken v.l.n.r.) des Albumins, α -, β - und γ -Globulins, deren Korrekturflächeninhalte (oben) sich wie 58,5:8,1:12,5 und 21% verhalten. Diese Relation stimmt mit der für Normalserum angegebenen (59, 6, 15 und 20%) recht gut überein.

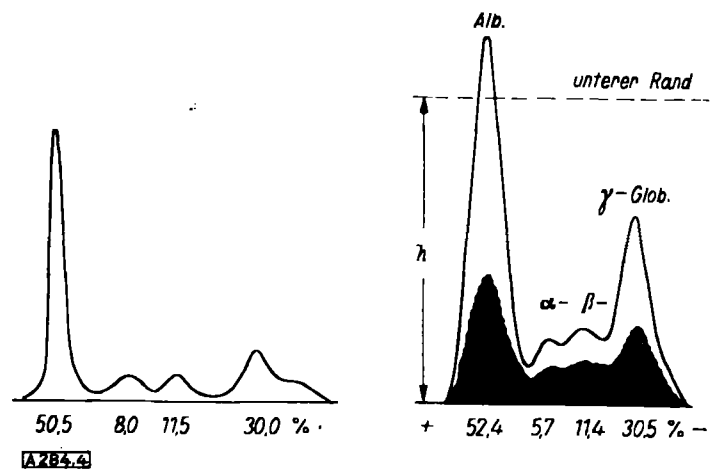


Bild 4

Oben: Plasmocytom-Serum. Kompakte Kurve rechts: Schattenriß des Originalretentiogramms, darüber: umgezeichnete Kurve, links: dasselbe Serum im Tiselius-Apparat analysiert

Zur Illustration der Brauchbarkeit unserer Methode sind noch weitere Diagramme wiedergegeben, die in folgender einfacher Weise reproduziert wurden: Man legte die nach der Rubenwasserstoff-Behandlung durch Baden in 1 n-Soda-Lösung und Wasser vom Farbstoff völlig befreiten, trocknen Papiere in einen Kopierahmen auf Bromsilberpapier und belichtet, nachdem man die obere Kante der Kupferfront durch einen horizontalen Schwarzpapierstreifen eben abgedeckt hat, etwa 10 sec. Die abgebildeten Diagramme zeigen nun die Cu-freien Flächen als kompakte schwarze Hügel; zur Auswertung müssen diese in der oben beschriebenen Weise umgezeichnet werden, was in Bild 4, rechts, dem Pherogramm des Serum eines Plasmocytomkranken, geschehen ist. Hierin sieht man eine deutliche γ -Globulin-Vermehrung gegenüber dem Normalwert (52,4% Albumin, 30,5% γ -Globulin), welche in der gleichen

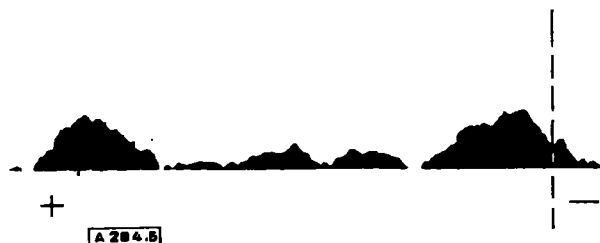


Bild 5

Serum A. L. Periarthritis nodosa mit starken Oedemen
Ges. Eiweiß nur 4,26%, durch Fraktionierung bestimmt: 1,32% Alb.
2,34% Globuline



Bild 6

Serum P. M. Endocarditis lenta, stark vermehrtes γ -Globulin (rechts)

Größenordnung am selben Serum in der *Tiselius*-Apparatur gefunden wurde (50,5% Albumin, 30,0% γ -Globulin, Bild 4 links^{*)}). Die weiteren Diagramme (Bilder 5 u. 6) zeigen Originalkontaktabzüge der Pherogramme verschiedener pathologischer Seren und vom



Bild 7

Pherogramm von Cobra-Gift

rohen Cobratoxin (Bild 7). Auch andere natürliche Proteingemische (Eiereiweiß, Milchproteine, Hefemacerationssaft usw.) lassen sich so trennen und auswerten. Die Konzentration an den einzelnen Komponenten soll dabei mindestens 0,5% betragen; es lassen sich aber noch 0,1% eben nachweisen.

Für die Anwendung der Methode in der Klinik kann man sich einer bequemeren, dafür aber etwas ungenaueren Auswertung bedienen. Es lassen sich nämlich die Originalrücken graphisch in Dreiecke etwa gleichen Flächeninhalts verwandeln. Die in der oben ausgeführten Weise verzerrten Dreiecksflächen $\frac{1}{2} \text{Basis} \times \left(\frac{h_{\max}}{y} - 1 \right)$ sind verständlicherweise ebenfalls den Protein-Konzentrationen proportional. Der Vergleich von Konzentrationsverhältnissen, die einmal durch Integrieren der umgezeichneten Kurvenzüge und zum anderen auf die vereinfachte Weise am selben Pherogramm gewonnen wurden, ergibt gegenseitige Maximalabweichungen von $\pm 10\%$.

Fraülein E. Ringelmann danken wir sehr für die Anfertigung des photographischen Illustrationsmaterials, W. Möhle für die Zeichnungen.

Eingeg. am 16. Juli 1950. [A 284]

^{*)} Die Vergleichselektrophorese wurde von Dr. Sandkühler an der Med. Univ.-Klinik Heidelberg durchgeführt, dem wir dafür und für die Überlassung anderer Serumproben zu danken haben.

Sterische Hinderung und cis, trans-Isomerie bei der Dienreaktion konjugiert-ungesättigter Fettsäuren

Die Pandienzahl

Von Dr. J. D. von MIKUSCH, Hamburg-Harburg. F. Thörl's Vereinigte Harburger Ölfabriken

Bei künstlich konjugierten Ölen und Fettsäuren ergibt die Dienzahlbestimmung bedeutend kleinere Werte als die UV-Methode. Offensichtlich werden einige Isomere nicht erfaßt. Es wurde daher eine abgewandelte Untersuchungsmethode entwickelt, welche es ermöglicht, quantitativ die konjugiert-ungesättigten Bestandteile als „Pandienzahl“ zu erfassen, und mit deren Hilfe es u. a. möglich ist, in die Verteilung der Isomeren Einblick zu erhalten.

I. Unterschiede bei der Bestimmung der Konjugation auf dieneometrischen und anderen Wegen

Die „Diensynthese“ nach Diels und Alder wurde zuerst von Kaufmann und Baltes¹⁾ zur quantitativen Bestimmung von konjugierten Doppelbindungen in Fettsäuren und Ölen herangezogen. Dabei läßt man Maleinsäureanhydrid in Aceton-Lösung bei 100° C im Überschuß auf den Fettkörper wirken, und das unverbrauchte Anhydrid wird als Säure zurückeritriert. Eine von Ellis und Jones²⁾ vorgeschlagene Form unterscheidet sich hiervon im wesentlichen durch die Verwendung von Toluol als Lösungsmittel und eine höhere Arbeitstemperatur bei kürzerer Einwirkungs-dauer. An allen bisher nach diesen Methoden untersuchten Verbindungen, wie α -, β - und Pseudoeläostearinsäure, α - und β -Licansäure, 9,11-Octadecadiensäure (Fp 54°) und 10,12-Octadecadiensäure (Fp 57° C) sowie deren Estern, wurden theoretische Werte für die Anlagerung von je einer Molekel Maleinsäure an ein konjugiertes System beobachtet.

¹⁾ Fette u. Seifen 43, 93–97 [1936].

²⁾ Analyst 61, 812–816 [1936].

Da somit alle bekannten und rein isolierbaren konjugierten Fettsäuren und deren Abkömmlinge quantitativ auf die Bestimmung mit Maleinsäureanhydrid ansprechen, galten die nach dieser Methode ermittelten „Dienzahlen“ als ein zuverlässiges Maß für die in Fetten und Ölen vorhandene Konjugation. Zwischen den Ergebnissen der Methoden von Kaufmann und Baltes einerseits und Ellis und Jones andererseits zeigten sich nur geringe Unterschiede, doch konnte in einem Fall³⁾ gezeigt werden, daß geringe Abweichungen bei letzterer bei Anwesenheit von Hydroxyl-Gruppen auftreten können.

Später gelang es auch durch spektrophotographische oder spektrophotometrische Messung der Absorptionsfähigkeit im Ultraviolett, den Anteil an konjugierten Doppelbindungen zu bestimmen. Die Anwendung dieses Verfahrens auf Fettstoffe wurde von Kass ausführlich beschrieben⁴⁾. Eine eingehende Behandlung in deutscher Sprache liegt von Kaufmann und Volbert

³⁾ Pelikan, K. A. u. v. Mikusch, J. D., Oil and Soap 14, 209–210 [1937].

⁴⁾ Kass, J. P. in Mattiello, J. J.: „Protective and Decorative Coatings“ IV., 362–405, New York [1944].