

Zeitschrift für Ernährungswissenschaft

Journal of Nutritional Sciences · Journal des Sciences de la Nutrition

Band 6

Heft 1

Juli 1965

Aus dem Universitäts-Institut für Lebensmittelchemie, Frankfurt a. M.

Das Verhalten der schwefligen Säure in biologischen Flüssigkeiten und die Möglichkeiten zu ihrer Bestimmung

1. Mitteilung

Von W. DIEMATIR und I. ENGELHARDT

Mit 3 Abbildungen und 8 Tabellen

(Eingegangen am 2. Februar 1965)

Einführung

Die schweflige Säure ist ein wichtiges Desinfiziens, Konservierungsmittel und Antioxydans bei der Herstellung und Zubereitung von Nahrungsmitteln und kann auch in der modernen Nahrungsmittelindustrie nicht entbehrzt werden. Welche Mengen an schwefliger Säure vom Menschen vertragen werden, ohne daß Beschwerden auftreten, ist aber nicht mit Sicherheit entschieden. Eine Zusammenstellung über die Verträglichkeit der schwefligen Säure für den Menschen bringt K. LANG (1) in seinem Gutachten über die physiologischen Wirkungen der schwefligen Säure. Er hat die Untersuchungsergebnisse von sieben Autoren zusammengestellt. Wurden Beschwerden nach Einnahme von schwefliger Säure festgestellt, so waren es immer die gleichen: Magenbeschwerden, Durchfälle und Kopfschmerzen. Interessant war der große Unterschied innerhalb der Dosierungen. Es wurden Mengen von 2000 bis 650 mg SO₂ symptomlos vertragen, während Mengen von 500 bis 10 mg SO₂ Beschwerden verursachten. LANG schätzt deshalb, daß etwa 10 bis 20% der Konsumenten auf SO₂ mit subjektiven Beschwerden reagieren würden, wenn es zu einer Erhöhung der erlaubten SO₂-Mengen kommt. LANG stützte sich dabei auf die Untersuchungen von C. JAKOBY und H. WALBAUM (2), die die Beschwerden bei den niedrigsten Dosen festgestellt hatten.

Die Empfindlichkeit mancher Versuchspersonen gegenüber schwefliger Säure steht im Gegensatz zu den Tierversuchen, die auch in jüngster Zeit angestellt wurden.

M. F. LOCKETT und I. L. NATOFF (3) verabreichten 750 ppm (mg/l) SO₂ als Natriummetabisulfat im Trinkwasser an drei Generationen von Ratten, in Experimenten, die beinahe drei Jahre dauerten. Das Metabisulfat war ohne Effekt auf das Wachstum, die Aufnahme von fester und flüssiger Nahrung und die Ausscheidung des Kotes. Es beeinflußte nicht die Fruchtbarkeit, das Gewicht der Neugeborenen und die Laktation, ferner ließ es nicht die Häufigkeit der Tumorbildung ansteigen. Die histologische Prüfung der Organe bei einem Teil der Ratten nach 10 Monaten ergab keine Abnormitäten.

Wie schon F. FRANZ und G. SONNTAG (4, 5) beim Hund und beim Menschen festgestellt hatten, daß Sulfit im Harn zum größten Teil als Sulfat ausgeschieden wird, konnten B. BAGHAT und M. F. LOCKETT (6) an Ratten bestätigen. 53% des verfütterten Natriummetabisulfits ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) wurden, innerhalb der ersten vier Stunden nach Eingabe, als Sulfat im Harn ausgeschieden. Dabei wurde ein geringer Anstieg der jodreduzierenden Substanzen im Harn festgestellt. Dieser Anstieg kann einmal auf Sulfit, aber auch auf Thiosulfat zurückzuführen sein. Nach B. H. SORBO (7) führt die Rattenleber, in der Gegenwart von Sulfit, Merkaptopyruvat schnell und quantitativ in Thiosulfat über. Thiosulfat kommt in kleinen Mengen im Harn von Menschen, Hunden und Katzen immer vor. Der leichte Anstieg an jodreduzierenden Substanzen kann daher auch auf eine, in Gegenwart von Sulfit vermehrte, Ausscheidung von Thiosulfat zurückzuführen sein.

B. BAGHAT und M. F. LOCKETT verglichen die Ausscheidungen im Harn nach Einführung von Natriummetabisulfit-, Natriumthiosulfat- und Sulfatlösungen mit einer Magensonde und nach der intraperitonealen Injektion der gleichen Lösungen. In den ersten vier Stunden nach der Injektion wurden 80–90% des zugeführten Schwefels als anorganisches Sulfat ausgeschieden. Die Form und das Ausmaß der Ausscheidung war bei allen drei Lösungen gleich. Bei jeder Lösung wurden sehr geringe Mengen an jodreduzierenden Substanzen im Harn festgestellt.

Innerhalb der ersten vier Stunden nach Eingabe der Lösungen mit der Magensonde wurden ungefähr 55% der Schwefelmenge vom Metabisulfit, 23% vom Thiosulfat und 7% vom Sulfat im Harn als Sulfat ausgeschieden. Metabisulfit wird also vom gastrointestinalen Trakt schneller resorbiert als Thiosulfat. Sulfat wird nur zu einem geringen Teil resorbiert.

Nachdem verschiedene Autoren festgestellt haben, daß im Organismus eine Oxydation der schwefligen Säure erfolgt, was gleichbedeutend mit einer Entgiftung derselben ist, blieb die Frage offen, wo im Organismus diese Oxydation stattfinden könnte.

Über den Ort der Oxydation der schwefligen Säure im Organismus wurden umfangreiche amerikanische Arbeiten angestellt.

Diese Arbeiten gingen ursprünglich davon aus, die Oxydation des Schwefels aus den schwefelhaltigen Aminosäuren zu verfolgen. Die biologische Oxydation von Cystein soll z. B. über die Cysteinsulfinsäure, β -Sulfinylbrenztraubensäure zum Sulfit verlaufen (8). Der Mechanismus der Sulfitoxydation war aber noch ungeklärt.

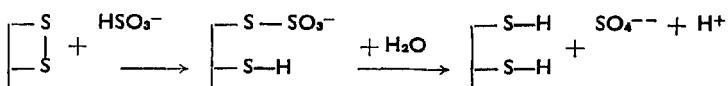
M. HEIMBERG, I. FRIDOVICH und PH. HANDLER (9) gelang die Oxydation von Bisulfit mit Leberpräparaten von Ratten, Schweinen, Mäusen und Hamstern. Die Leberpräparate wurden aus Aceton-Trockenpulvern extrahiert. Sie oxydierten auch eine Reihe von α -Hydroxy-, α -Amino- und N-substituierten α -Aminosulfonsäuren. Wurden bei pH 5,3 die unlöslichen Proteine entfernt, ging die Fähigkeit, die Sulfonsäuren aufzuspalten, verloren. Die Sulfitoxydation wurde davon nicht berührt.

In weiteren Untersuchungen stellten I. FRIDOVICH und PH. HANDLER (10) fest, daß nur die mitochondriale Fraktion von Organgeweben imstande ist, die Sulfitoxydation zu katalysieren. Nach einer teilweisen Reinigung mit Ammoniumsulfatfällungen, Protaminfällung und Proteinfällung bei 55 °C wurde eine Enzymlösung erhalten, die zwar die Oxydation des Sulfits, aber nicht mehr die

der Carbonylverbindungen katalysieren konnte. Nach Säurehydrolyse der Enzymlösung konnte Riboflavin papierchromatographisch nachgewiesen werden.

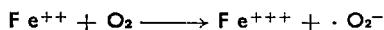
In weiteren Arbeiten stellten I. FRIDOVICH und PH. HANDLER (11) und (12) nach Dialyse der Enzymlösung fest, daß die anaerobe Oxydation von Sulfit inaktiviert wurde. Sie ermittelten als aktives Prinzip das Hypoxanthin. Daraus und aus ihren früheren Ergebnissen schlossen sie, daß der Enzymkomplex die reversible Teilnahme von Hypoxanthin oder Inosin und ein Flavoprotein einschließt.

Sie unterließen darauf die weitere Untersuchung des sulfitoxydierenden Enzyms und wandten sich der Aufklärung des Mechanismus der Sulfitoxydation zu. Sie (13) kamen zu der Annahme, daß die Sulfitoxydation von einer reversiblen Reduktion und Oxydation einer Disulfidverbindung begleitet wird. Ihre Vermutung stützten sie auf die Hemmung der anaeroben Reduktion von Methylenblau mit Arsenit und p-Chlormercuribenzoat (p-CMB), einem typischen Sulfhydrylreagenz. Die aerobe Oxydation von Sulfit wurde dagegen nur wenig gehemmt. Ferner ermittelten sie einen Anstieg der Sulfhydrylgruppen nach Zugabe von Sulfit, wenn das Enzym vorher mit p-CMB behandelt wurde. Die Sulfhydrylgruppen wurden mit der BOXER-Methode (14) bestimmt. Das Enzymsystem war auch in der Lage, Cystein und Dimerkaptolipoat zu oxydieren. Die Sulfitoxydation wurde durch Liponsäure gesteigert, durch Cystin, Cysteinthsulfonat und Thiosulfat gehemmt. FRIDOVICH und HANDLER nahmen daher für die Sulfitoxydation folgende Reaktionsfolge an, bei der die Liponsäure als Disulfitquelle dienen sollte:



Ausgehend von dem Ergebnis, daß Hypoxanthin als ein obligatorischer Kofaktor für die Oxydation von Sulfit durch das Leberenzym dient, untersuchten I. FRIDOVICH und PH. HANDLER (15) die Xanthinoxidase = XO. Die Leberpräparate wiesen keine Xanthinoxidase-Aktivität auf. Gereinigte XO aus Milch war ebenfalls nicht in der Lage, die Sulfitoxydation zu katalysieren. Konnte aber die XO auf ein Gemisch von Sulfit und Hypoxanthin einwirken, so gelang es, Sulfit zu oxydieren. Die Behandlung der XO mit Cyanid unterband vollständig die Oxydation von Hypoxanthin, erlaubte aber die Oxydation von Sulfit in Gegenwart von katalytischen Mengen Hypoxanthin, aerob und anaerob. In säurehaltigen Lösungen von pH 7,6 und in Gegenwart von Cyanid wurde die aerobe Sulfitoxydation auch von denaturierter XO katalysiert. Hypoxanthin war dabei nicht erforderlich. FRIDOVICH und HANDLER schlossen daraus, daß es eine nichtenzymatische (hypoxanthinunabhängige und eine enzymatische (hypoxanthinabhängige) Katalyse der Sulfitoxydation gibt. Sie nahmen an, daß eine Wechselbeziehung zwischen Sulfit und dem Metall des Enzyms bestehen muß, und Hypoxanthin dabei die Rolle des Elektronentransportes übernimmt. Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus der Sulfitoxydation prüften I. FRIDOVICH und PH. HANDLER (16) die katalytischen Wirkungen von Fe(II)- und Fe(III)salzen auf die Sulfitoxydation. Fe(II)salz war der bessere Katalysator. Die leichte katalytische Aktivität des

Fe(III)salzes könnte auf eine geringe Reduktion des Fe(III) zum Fe (II) durch Sulfit zurückzuführen sein, FRIDOVICH und HANDLER nahmen an, daß an der aktiven Seite der XO 2 Moleküle Flavinadenosindinucleotid sitzen, die durch zwei eisenhaltige Merkaptogruppen verbunden sind. Die Eisenatome sollen dabei Elektronen von einem Flavin-adenosin-dinucleotid-Molekül zum anderen übertragen. Da die angenommene Elektronentransportfunktion des Eisens eine vorübergehende Existenz des Fe(II)-Stadiums einschließt, schien es möglich, daß dieses Fe(II)-Ion direkt mit O₂ reagiert und ein O₂-Radikal wie folgt produziert:



Dieses Sauerstoffradikal könnte gut die Sulfitoxydation auslösen, und die Oxydation des Sulfits wäre somit eine Kettenreaktion.

Bernsteinsäure-Dehydrogenase aus Rinderherzmitochondrien, Glucose-Oxydase, D-Aminosäure-Oxydase, Milchsäure-Dehydrogenase, Alkohol-Dehydrogenase und Urease vermochten die Sulfitoxydation nicht auszulösen. Dies steht im Einklang damit, daß diese Enzyme nicht direkt mit Sauerstoff reagieren können.

Ausgehend von der Hypothese, daß die Oxydation von Sulfit durch Xanthinoxidase eine Radikalkettenreaktion ist, untersuchten I. FRIDOVICH und PH. HANDLER (17) noch weitere Enzyme. Sie waren überzeugt, daß eine enzymatische Sulfitoxydation nur erfolgt, wenn im Laufe der Reaktion freie Radikale entstehen. Ein Molekül H₂O₂ oxydierte nämlich nur 3 Sulfitionen, während in Gegenwart von Xanthinoxidase und Xanthin 10000 Sulfitionen oxydiert wurden, pro Molekül Xanthin.

L-Aminosäure-Oxydase, Pilztyrosinase, Katalase, Cytochrom-Oxydase und Ferrocyanochrom c waren nicht imstande, die Sulfitoxydation zu katalysieren. Eine Oxydation von Sulfit wurde von folgenden Enzymen eingeleitet:

Xanthin-Oxydase aus Kalbsleber

Kaninchen-Leberaldehyd-Oxydase mit N-Methylnikotinamid als Substrat Azid-Katalase, in Gegenwart von H₂O₂

Rettich-Peroxydase, in Gegenwart von H₂O₂ mit einem reduzierbaren Substrat wie Phenol

Cytochrom-Oxydase, bei der aeroben Oxydation von Ferrocyanochrom c Lipoxydase in Gegenwart von Linolsäure und

Kaninchenlebermikrosomen in Gegenwart von reduziertem Triphosphopyridinnucleotid (TPNH).

Von den untersuchten Flavoproteinen leiteten nur die Xanthinoxidase der Milch, der Kalbsleber und die Aldehydoxydase der Kaninchenleber die Sulfitoxydation ein. FRIDOVICH und HANDLER führten dies auf die Möglichkeit zurück, daß die metallischen Komponenten der Enzyme in einem gewissen Ausmaß direkt den Elektronentransport zum Sauerstoff übernehmen.

Nachdem M. HEIMBERG, I. FRIDOVICH und PH. HANDLER (9) ein Enzymsystem in der Leber gefunden hatten, das imstande war, die Sulfitoxydation zu katalysieren und I. FRIDOVICH und PH. HANDLER sich der Aufklärung des Reaktionsmechanismus widmeten und dabei noch weitere Enzyme ermittelten, die Sulfit oxydieren bzw. die Oxydation katalysieren konnten, beschäftigten

sich R. M. MACLEOD, W. FARKAS, I. FRIDOVICH und PH. HANDLER (18) eingehender mit der Reinigung und den Eigenschaften der Lebersulfitoxydase. Die Reinigung der Sulfitoxygenase, extrahiert aus Rattenleber-Aceton-trockenpulver, Rinderleber-Aceton-trockenpulver und Hundeleber wurde beschrieben. Die Reinigung war differenzierter als die früher von M. HEIMBERG angegebene und schloß z. T. eine Absorption an Calciumphosphatgel und eine Auf trennung über Zellulosesäulen ein.

Das gereinigte Enzym katalysierte die Oxydation von Sulfit in Gegenwart von verschiedenen Elektronenakzeptoren: O_2 , Cytochrom c, Ferricyanid und 2,6-Dichlorphenol-indophenol. Die Reduktion von Cytochrom c, Ferricyanid, 2,6-Dichlorphenol-indophenol wurde spektralphotometrisch verfolgt, korrigiert durch die Ergebnisse für die nichtenzymatische Reduktion durch Sulfit. An der Reduktion des Cytochrom c wurde die Substratspezifität des Enzyms untersucht. Sulfit konnte nicht ersetzt werden durch DPNH, TPNH, Succinat, Thiosulfat, Dithionat, Cysteinsulfat, Cystein-thiosulfat, Lactat, Acetaldehyd, Hypoxanthin oder Selenit. Mit Sulfit als Substrat katalysierte das Rinderleber-enzym die Reduktion von Cytochrom c, O_2 , Ferricyanid und Methylenblau wie folgt:

$$100 : 114 : 1420 : 6,7.$$

Das gereinigte Enzym war unter p_H 7,0 unstabil, aber ganz stabil zwischen p_H 7,0 und 9,5. Durch Dialyse verringerte sich die Aktivität. Die K_m = Michaeliskonstante für Sulfit betrug beim Rinderleberenzym $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, beim Hundeleberenzym $2,7 \cdot 10^{-5}$ M.

Die Cytochrom-c-Reduktion wurde gehemmt durch Ag^+ , Hg^{++} und p-CMB. Hemmung mit Thiosulfat konnte durch Dialyse rückgängig gemacht werden. Die Hemmung mit Trypsin variierte mit dem verwendeten Elektronen-akzeptor.

Das Enzym von Rinder-, Hund- und Rattenleber hatte das gewöhnliche Absorptionsmaximum der Proteine bei 280 nm und einen zusätzlichen Peak bei 413 nm. Anaerobe Zugabe von Sulfit verschoß diesen auf 423 nm. Rinder-enzym hatte nach Zugabe von Sulfit zwei neue Absorptionsmaxima bei 528 und 556 nm. In allen Fällen hob eine Belüftung die spektralen Veränderungen auf. Das Absorptionsspektrum des mit Sulfit behandelten Rinderenzyms glich vollständig dem von reduziertem Cytochrom b₅. Cytochrom b₅ ließ sich aber nicht durch Sulfit reduzieren, noch hatte es Sulfitoxygenase-Aktivität. Ferner konnte Cytochrom b₅ Cytochrom c als Elektronenakzeptor nicht ersetzen.

Das Rinderleberenzym wurde in der Ultrazentrifuge untersucht. Es wurde festgestellt, daß Sulfitoxygenase-Aktivität und ein rotes Protein zusammen sedimentierten. In diesem rot gefärbten Protein wurde nach Abspaltung der Eiweißkomponente und nach Reduktion Protohämin nachgewiesen.

Bei der aeroben Sulfitoxygenation war der O_2 -Verbrauch und der Sulfitschwund stöchiometrisch nach der Gleichung:



Zugabe von Katalase und Aethanol verdoppelten den O_2 -Verbrauch, was die Bildung von H_2O_2 bei der aeroben Wiederoxydierung des reduzierten Enzyms anzeigen sollte.

Verschiedene Gewebe und Zellteile wurden auf ihre Sulfitoxydaseaktivität geprüft. Nach der Separation der Gewebe im Nucleus, Mitochondria und Mikrosomen nach der Methode von W. C. SCHNEIDER und G. H. HOGEBOOM (19), Herstellung eines Aceton-Trockenpulvers und Extraktion desselben mit Pufferlösung, wurde die größte Sulfitoxydase-Aktivität in der Mikrosomenfraktion gefunden. Es war merkwürdig, daß vor der Herstellung des Aceton-Trockenpulvers die Aktivität der Mikrosomenfraktion nur sehr gering war. Von den Geweben waren Leber, Niere, Herz reich an aktivem Enzym, während Gehirn, Hoden, Lunge und Milz relativ wenig Aktivität aufwiesen. Diese Ergebnisse stimmten mit dem Cystein-Desulfinitikase-Vorkommen überein, das in der Leber und in der Niere größer ist als im Gehirn. Cystein-Desulfinitikase stellt die Quelle des Sulfits im Säugetierstoffwechsel dar.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß R. M. MACLEOD ein Enzym gefunden hat, das Sulfit oxydiert. Ob Sulfit das alleinige Substrat ist, ist nicht sicher, aber wahrscheinlich.

Das Enzym ist ein Hämoprotein, dessen Absorptionsspektrum vergleichbar ist mit dem von Cytochrom b₅. Da bei der Oxydation von Sulfit H₂O₂ gebildet wird, kann eine Flavin- oder hydrochinoidre Gruppe an der Reduktion des Sauerstoffes teilnehmen. Eine nichtenzymatische, metallkatalysierte Radikalkettenreaktion, wie sie bei der Autoxydation von Sulfit stattfindet, wird als unwahrscheinlich angesehen. Dieser Prozeß erfordert für die effektive Ausbreitung der SO₃²⁻-O₂-Kettenreaktion eine relativ hohe Konzentration an Sulfit (10⁻³ M). Sie tritt auch nicht leicht in lebenden Geweben auf, da dort zuviel Kettenbrecher vorhanden sind.

I. FRIDOVICH und PH. HANDLER (16) hatten aber festgestellt, daß Xanthinoxidase, wenn sie auf ihre Substrate einwirkt, die Autoxydation von Sulfit in einer freien Radikalkettenreaktion auslösen kann. R. M. MACLEOD, I. FRIDOVICH und PH. HANDLER (20) untersuchten deshalb nochmals den Mechanismus für ihre, aus der Leber isolierten, anscheinend sulfit-spezifischen Oxydase. Die extrem rasche aerobe Sulfitoxydation durch Leberextrakte konnten sie auf Grund ihrer Untersuchungen so erklären: Sulfitoxydase im nur teilweise gereinigten Leberextrakt oxydiert Sulfit unter gleichzeitiger Bildung von H₂O₂. Hämoglobin, das auch in dem Extrakt noch erhalten ist, besitzt peroxydative Aktivität. Wie Peroxydase in der Gegenwart von Peroxiden und peroxydierbarem Substrat, erzeugt es reaktive Radikale, die eine schnelle Kettenreaktion zwischen Sulfit und O₂ auslösen können. Dies wurde bewiesen durch Zugabe von peroxydierbaren Komponenten, durch welche die Sulfitoxydation gesteigert wurde. Kettenbrecher wie Mannitol, Cystein und Askorbat hemmten die Sulfitoxydation.

Ferner widerlegten sie die frühere Behauptung, daß Hypoxanthin als Kofaktor bei der Oxydation von Sulfit durch Leberenzym dient. Es wurde nachgewiesen, daß in dem grob gereinigten Hundeleberpräparat eine geringe Xanthinoxidase-Aktivität vorhanden ist. Xanthinoxidase aber löst, wenn sie auf ihre Substrate einwirkt, eine freie Radikalkettenreaktion durch Bildung eines Perhydroxylradikals zwischen SO₃²⁻ und O₂ aus, sofern die Sulfitkonzentration groß genug ist, um die Kettenreaktion aufrechtzuerhalten.

Bei der anaeroben Methylenblau-Reduktion durch Xanthinoxidase und Sulfit, bei der Hypoxanthin auch erforderlich war, ließ sich dies auf die Gegenwart von Restsauerstoff zurückführen. Dieser Restsauerstoff verhinderte die

Bildung von Leukomethylenblau. Bei Anwesenheit von Sulfit und Hypoxanthin löste Xanthinoxidase eine Kettenreaktion aus, bei der der Restsauerstoff schnell verbraucht wurde und Methylenblau-Reduktion erfolgen konnte. Für die Sulfitoxygenase ist also die Anwesenheit von Hypoxanthin nicht erforderlich. Es wird angenommen, daß die Kettenreaktion nur eine künstliche Reaktion des isolierten Systems ist. Im lebenden Gewebe scheinen die relativ niedrige Sulfitkonzentration und die hohe Konzentration an Kettenbrechern kettenfortpflanzende Radikale nicht zu erlauben.

Nach diesen Ergebnissen der amerikanischen Autoren kann eine Sulfitoxygenation im Organismus hauptsächlich in folgenden Organen stattfinden: Leber, Niere und Herz.

Die Entgiftung der schwefligen Säure wird demnach von der Konzentration und der Zeit abhängen. Außerdem wird sie, wie LANG (1) anführt, individuell verschieden sein. Eine hinreichend genaue Angabe über die verträglichen Mengen an schwefliger Säure könnte daher nur durch eine Reihe von Tierversuchen oder durch Testen einer großen Anzahl von Versuchspersonen festgestellt werden.

BAGHAT und LOCKETT (6) hatten an Tierversuchen festgestellt, daß innerhalb von 4 Stunden 55% der als Metabisulfit mit einer Magensonde eingebrachten Schwefelmenge im Harn als Sulfat erscheint. Im Gegensatz dazu wurden von dem eingegebenen Thiosulfat nur 23% und von Sulfat nur 7% im Harn als Sulfat ausgeschieden. Das Metabisulfit wurde also schneller vom gastrointestinalen Trakt resorbiert als Thiosulfat und Sulfat. Was passierte aber mit den restlichen 45% an Metabisulfit? War die Resorptionsgeschwindigkeit doch nicht so groß, daß innerhalb der 4 Stunden alles Metabisulfit resorbiert werden konnte, oder erfolgte im Magen-Darmtrakt eine Sulfitoxygenation zum Sulfat, dessen Resorption erwiesen gering ist? Zur Klärung dieser Frage sollte Sulfit in vitro biologischen Flüssigkeiten, wie Speichel, Magen und Darmsaft zugesetzt werden und eine eventuelle Oxydation verfolgt werden. Daneben sollte auch das Verhalten von Leberhomogenisat und Blut gegenüber Sulfit studiert werden.

Diese Untersuchungen erforderten eine Bestimmungsmethode für Sulfit, bei der die physiologischen Bedingungen möglichst erhalten blieben, um eine Veränderung des Sulfits durch äußere Einflüsse auszuschalten. Es wurde daher die Hemmung der Lactatdehydrogenase durch Sulfit nach PFLEIDERER (21) für eine quantitative Sulfitbestimmung direkt in den biologischen Flüssigkeiten untersucht. G. PFLEIDERER (21) war es gelungen, die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LdH) aus Herzmuskel mit Mengen von $< 2 \gamma$ Sulfit zu 25% zu hemmen. Dies erschien als eine Möglichkeit, geringe Sulfitmengen in wenig Untersuchungsflüssigkeit zu bestimmen, sofern es gelang, die Hemmung quantitativ zu verfolgen.

Lactatdehydrogenasen katalysieren die Reaktion



DPN = Diphosphopyridin-nucleotid

DPNH = reduziertes Diphosphopyridin-nucleotid

wobei das Gleichgewicht weit auf der Seite von Lactat und DPN liegt, so daß man zu Aktivitätsmessungen immer den umgekehrten Vorhang benutzt (22).

Experimenteller Teil

Material und Methoden:

1. Die zum Hemmungstest erforderliche Lactat-Dehydrogenase wurde nach einer modifizierten Methode von F. B. STRAUB (23) aus Schweineherzen isoliert. Die Proteinmenge wurde mit dem Biuretttest (24) bestimmt.
2. DPN und DPNH wurden von der Firma Boehringer in Mannheim bezogen.
3. Für die Brenztraubensäurelösung wurde das Natriumsalz der Brenztraubensäure (Merck) mit Wasser zu einer 0,1 M Lösung gelöst. Die Brenztraubensäure wird im folgenden mit BTS abgekürzt.
4. Die Sulfitlösungen wurden aus entwässertem Natriummetabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) hergestellt. Ihr Gehalt an SO_3^- wurde jodometrisch überprüft.
5. Als Pufferlösung diente ein M/15 Phosphatpuffer pH 7,2 nach SÖRENSEN. Die Einstellung der Pufferlösung erfolgte mit einem Methrom pH-Meter Type E 196 S.

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser bereitet.

DPN und DPNH sind licht- und wärmeempfindlich, DPNH säure- und DPN alkalieempfindlich. Ihre Lösungen in Puffer wurden täglich frisch hergestellt. Die LDH wurde mit Puffer entsprechend verdünnt. Alle Lösungen wurden während der Messung in Eis aufbewahrt. Nur der Puffer wurde auf 25°C vortemperiert. Die kalten Lösungen wurden in eine Temperierküvette, die schon den Puffer enthielt, eingeschüttet und die Reaktion bei 25°C durchgeführt. Der Testansatz für die Hemmungsversuche hatte folgende Zusammensetzung:

$$\begin{aligned} & 1,9 \text{ ml Phosphatpuffer pH 7,2} \\ & 0,04 \text{ ml DPNH} = 6,14 \times 10^{-7} \text{ Mol DPNH} \\ & 0,03 \text{ ml BTS} = 3,0 \times 10^{-6} \text{ Mol BTS} \\ & 0,03 \text{ ml LDH} = 4-5 \times 10^{-12} \text{ Mol LDH} \end{aligned}$$

Die Reaktion wurde im Photometer Eppendorf bei 366 nm verfolgt. Es wurde die Zeit gestoppt, bei der die Extinktion von DPNH um 0,1 abnahm. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Enzyms ausgelöst. Die Enzymaktivität in vorgenannter Testlösung ließ sich im Bereich von $1,56 \times 10^{-9}$ Mol SO_3^- bis $1,56 \times 10^{-7}$ Mol SO_3^- hemmen, das entspricht 0,1 bis 10 γ SO_3^- pro Testansatz (Abb. 1). Trägt man aber nach H. M. RAUEN (61) die Restaktivität gegen die Sulfitkonzentration auf, erhält man bis zu einer Sulfitkonzentration von etwa 5 γ SO_3^- im Testansatz eine Gerade (Abb. 2).

$$\text{Restaktivität} = \frac{v_i}{v} = \frac{\text{Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart des Inhibitors}}{\text{Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibitor}}$$

Es wurde die Standardabweichung für Proben verschiedenen Gehaltes nach folgender Formel

$$s = \sqrt{\frac{\sum \sum (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{N - M}}$$

berechnet. Dies ergab bei 8 Proben mit 24 Einzelmessungen eine Standardabweichung von $s = 5,26 \text{ ppm SO}_3^-$ abs. mit einem Streubereich bei 95%iger Sicherheit von $\Delta x = 11,15 \text{ ppm SO}_3^-$ abs.

Die Enzymhemmungsmethode versagte in gefärbten und stark eiweißhaltigen Flüssigkeiten, so daß Sulfit in diesen Proben vor der Bestimmung isoliert werden mußte.

Das Sulfit wurde aus den Proben in einer 1:10 verkleinerten Reith-Willemsapparatur mit einer Kühlrlänge von 30 cm nach dem Ansäuern mit verdünnter Salzsäure abdestilliert. Als Trägergas diente Stickstoff, der vorher eine Lösung von Anthrachinon-β-sulfonsaurem Natrium passierte. In der Vorlage befanden sich 3 ml mit Eis gekühlte N/10 Natronlauge. Die Vorlage wurde nach dem vollständigen Übergang des SO_3^- mit Salzsäure neutralisiert und diese Lösung zur Sulfitbestimmung verwendet.

Ferner kamen zur Sulfitbestimmung noch die kolorimetrischen Methoden nach I. RICHTER und L. KNY (25) mit Malachitgrün und die nach PH. W. WEST und G. C. GAEKE (26) mit p-Rosanilinhydrochloridlösung zur Anwendung.

Bei der Methode nach WEST und GAEKE wurde bei 8 Proben mit 23 Einzelbestimmungen eine Standardabweichung von $s = 1,84 \text{ ppm SO}_2$ abs. mit einem Streubereich von $\Delta x = 3,8 \text{ ppm SO}_2$ abs. errechnet. Der Fehler ist bei dieser Methode also erheblich kleiner als bei der enzymatischen Bestimmung.

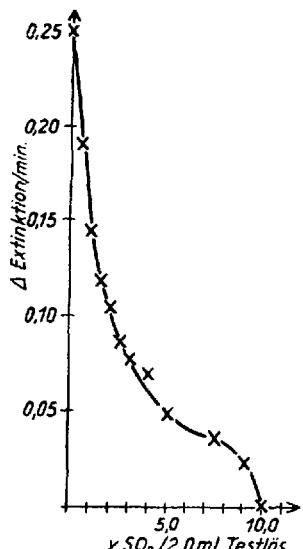


Abb. 1. Extinktionsabnahme von DPNH/Minute bei Anwesenheit von 0–10,0 γSO_2 in einem Testansatz von 2 ml.

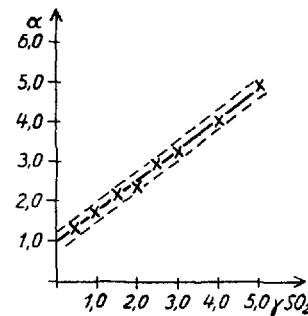


Abb. 2. Eichgerade für die LDH-Hemmung durch Sulfit. Abszisse: Sulfitkonzentration in γSO_2 . Ordinate: Restaktivität α . Gestrichelte Linien: Fehlerbreite der Mittelwerte.

Ergebnisse der Untersuchungen an mit Sulfit versetzten biologischen Flüssigkeiten

Speichel:

Von 6 Versuchspersonen standen jeweils etwa 10 ml Speichel zur Verfügung. Der Speichel wurde auf seinen pH-Wert geprüft und auf 37 °C im Thermostaten erwärmt. Dann wurde er mit Natriummetabisulfatlösung versetzt und 10 min in einem verschlossenen Gefäß bei 37 °C belassen. Anschließend wurde ver-

Tabelle 1

Versuchs-person	pH Wert	Zugesetztes SO_2 in mg/100 ml	Gefundenes SO_2 in mg/100 ml	Oxydiertes SO_2 in % d. zuges. Menge
1	6,2	7,04	6,16	12,4
2	7,1	8,48	7,35	13,4
3	6,7	8,34	6,78	18,6
4	6,7	13,18	10,88	17,4
5	7,0	7,56	6,49	14,2
6	7,2	10,00	7,24	27,6

Fehler: $\pm 0,38 \text{ mg}/100 \text{ ml}$

100 ml Speichel vermochten 0,88–2,76 mg SO_2 zu oxydieren.

sucht, direkt mit dem Speichel den Hemmungstest auszuführen. Die erhaltenen Werte lagen innerhalb der Fehlergrenze. Die Proben wurden daher destilliert und das SO₂ nach WEST und GAEKE mit Fuchsin-Aldehyd bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf 100 ml Speichel umgerechnet (Tab. 1).

Magensaft:

Für die Untersuchungen standen Magensafte von Patienten aus der Universitätsklinik zur Verfügung. Die Magensafte wurden mittels einer Magensonde den Patienten entnommen, die vorher zur Anregung der Magensekretion einen Coffeintrunk erhalten hatten. Das so gewonnene Produkt enthielt kein reines Magensekret, sondern ein Gemisch aus Coffeintrunk, Speichel und Magensaft. Diese Magensafte wurden je nach Menge mit Natriummetabisulfatlösung versetzt. Es wurden durchschnittlich 8,0 ml Magensaft mit 2 ml Sulfatlösung versetzt, so daß das Verhältnis 10:2 betrug. Die mit Sulfat behandelten Magensafte wurden in mit Schliffstopfen verschlossenen Reagenzgläsern im Thermostaten bei 37 °C verschieden lang inkubiert. Anschließend wurde der SO₂-Gehalt mit der Enzymhemmung bestimmt. Die meisten Magensafte zeigten keine Eigenhemmung, und die SO₂-Bestimmung konnte direkt ausgeführt werden. Wurde eine Eigenhemmung festgestellt, so wurde diese von der eigentlichen Sulfithemmung abgezogen. Parallelbestimmungen, bei denen das SO₂ herausdestilliert wurde, ergaben die gleichen Ergebnisse.

Die sulfithaltigen Magensafte wurden gegen eine wäßrige Natriummetabisulfatlösung von pH 5 gemessen, die eine Inkubationszeit von gleicher Dauer hinter sich hatte, um eine mögliche Autoxydation des Sulfits auszuschließen. Ein Zusatz von Komplexon zu den Magensaften zur Ausschaltung der Autoxydation wurde nicht angewandt, weil dies nicht den physiologischen Bedingungen entsprach. Die Autoxydation der wäßrigen Sulfatlösung während der Inkubationszeit war sehr gering.

Für den Vergleich der Oxydation von Sulfit durch verschiedene Magensafte wurde daher eine allgemeine Inkubationszeit von einer Stunde eingehalten.

Tabelle 2

Probe	pH	Zugesetztes SO ₂ in mg/100 ml Magensaft	Gefundenes SO ₂ in mg/100 ml Magensaft	Oxydiertes SO ₂ in mg/100 ml Magensaft	Oxydiertes SO ₂ in % d. zuges. Menge
1	2	4,17	2,10	2,17	52
2	2	6,25	5,50	0,75	12
3	2	6,25	4,13	2,12	39
4	2	8,33	8,33	0	0
5	2	16,70	16,00	0,7	4,2
6	3	12,50	12,50	0	0
7	3	12,50	6,25	6,25	50
8	5	5,50	4,78	0,72	13,1
9	6	12,50	11,62	0,88	7,04
10	6	12,50	10,45	2,05	16,4
11	7	5,56	2,50	3,06	55
12	7	8,06	4,03	4,03	50
13	7	12,50	6,25	6,25	50
14	7	12,50	7,63	4,87	39
15	7	16,70	9,42	7,28	43,6

Fehler: ± 1,1 mg SO₂/100 ml

Von 10 sauren Magensaften pH 2–6 zeigten 3 eine Oxydation von durchschnittlich 2,0 mg SO₂/100 ml Magensaft, einer oxydierte sogar 6,25 mg SO₂/100 ml Magensaft. Die oxydierten SO₂-Mengen unterhalb 1,1 mg/100 ml fallen unter die Fehlergrenze.

Von den alkalischen Magensaften, die mit einem physiologischen pH-Wert von 7 aus der Universitätsklinik bezogen wurden, zeigten sämtlich eine durchschnittliche Sulfitoxydation von 50%, unabhängig von der zugesetzten Sulfitmenge.

Duodenalsaft:

Duodenalsaft, durch Duodenalsondierung aus dem Duodenum gewonnen, besteht aus einer alkalischen Flüssigkeit, die auch als A-Galle bezeichnet wird, da sie zum großen Teil aus Gallensaft besteht. Nach dem Eingeben von Öl sezerniert die Gallenblase dickflüssige Blasengalle, die man mit B-Galle bezeichnet.

A- und B-Gallen, die einen pH-Wert von 7,0 bis 8,0 besaßen, wurden getrennt mit Natriummetabisulfitlösungen versetzt und auf 37 °C im Thermo- staten erwärmt. Die Oxydation des Sulfits trat wie bei den Magensaften spontan ein und steigerte sich nicht mit zunehmender Inkubationszeit. Bei Konzentrationen ab 100 ppm an Sulfit konnte eine Farbaufhellung der Gallensafte beobachtet werden. Eine direkte enzymatische Bestimmung war hier wegen der stark gefärbten Lösung nicht mehr möglich. Es wurde vor jeder SO₂-Bestimmung eine Destillation durchgeführt.

Ergebnisse mit A-Gallen: Inkubationszeit 1 h.

Tabelle 3

Probe	Zugesetztes SO ₂ in mg/100 ml A-Galle	Gefundenes SO ₂ in mg/100 ml A-Galle	Oxydiertes SO ₂ in mg/100 ml A-Galle	Oxydiertes SO ₂ in % d. zuges. SO ₂ - Menge
1	6,25	0	6,25	100
2	6,25	0	6,25	100
3	6,25	1,95	4,30	68,8
4	6,25	2,65	3,60	57,6
5	6,75	0	6,75	100
6	10,70	7,14	3,56	33,3
7	12,50	5,38	7,12	57
8	12,50	4,38	8,12	65
9	12,50	6,25	6,25	50
10	12,50	8,73	3,77	30,2
11	15,62	9,85	5,77	35

Fehler: $\pm 1,1$ mg SO₂/100 ml
A-Galle

Von 100 ml A-Galle wurden durchschnittlich 5,60 mg SO₂ oxydiert.

Ergebnisse mit B-Gallen: Inkubationszeit 1 h.

Von 100 ml B-Gallen konnten durchschnittlich 7,45 mg SO₂ oxydiert werden. Die oxydierten SO₂-Mengen betrugen bis auf eine Ausnahme rund 70% der zugesetzten Mengen.

Tabelle 4

Probe	Zugesetztes SO ₂ in mg/100 ml B-Galle	Gefundenes SO ₂ in mg/100 ml B-Galle	Oxydiertes SO ₂ in mg/100 ml B-Galle	Oxydiertes SO ₂ in % der zuges. SO ₂ -Menge
1	9,7	3,18	6,52	70,8
2	12,5	4,00	8,50	68,0
3	12,5	3,13	9,37	75,0
4	12,5	3,54	8,96	71,7
5	12,5	8,60	3,90	31,2

Fehler: $\pm 1,1$ mg SO₂/100 ml

Nachdem die Untersuchungen am Duodenalsaft gezeigt haben, daß von 100 ml Duodenalsaft durchschnittlich 5–7 mg SO₂ oxydiert werden können wurde untersucht, welcher Bestandteil des Duodenalsafes die Oxydation des Sulfits auslösen könnte. Es war naheliegend, an die Gallenfarbstoffe zu denken. Nach Zusatz von Sulfit wäre eine Aufhellung der Gallenfarbstoffe zu beobachtet gewesen.

Von den Gallenfarbstoffen wurden Biliverdin und Bilirubin untersucht. Von Biliverdin und Bilirubin wurden wässrige Lösungen hergestellt. Biliverdin wurde, da es schlecht wasserlöslich ist, in wenig verdünnter Natronlauge gelöst und mit Wasser aufgefüllt. Es wurden Lösungen von 10,0, 20,0, 25,0 und 50,0 mg Biliverdin und Bilirubin gesondert in 100,0 ml Wasser hergestellt und auf einen pH-Wert von 7–8 gebracht. Den Lösungen von Biliverdin und Bilirubin wurden 5 bis 25 mg ansteigend SO₂ zugesetzt. Nach der Destillation wurden die SO₂-Mengen mit dem Hemmungstest bestimmt. In keinem Fall war eine Oxydation des Sulfits zu beobachten. Auch Erhöhung der Inkubationszeit auf 3 Stunden veränderte das Ergebnis nicht. Die Oxydation des Sulfits im Darm kann also von den Gallenfarbstoffen allein nicht ausgelöst werden.

Leber:

Frischgeschlachtete Schweineleber wurde mit der 1,5fachen Menge Wasser im Starmix homogenisiert und 30 min unter Rühren extrahiert. Der Leberbrei wurde darauf durch Mull gestrichen. Der erhaltene Lebersaft wurde mit Lösungen von Natriummetabisulfit versetzt und im Thermostaten bei 37 °C in einem verschlossenen Gefäß inkubiert. Nach Verweilzeiten von $1\frac{1}{2}$ bis $1\frac{1}{2}$ Stunden wurde die Mischung destilliert und das SO₂ enzymatisch und mit Malachitgrünlösung bestimmt.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Die SO₂-Mengen wurden auf 100,0 g Leber umgerechnet.

Tabelle 5

Inkuba- tionszeit in h	Zugesetztes SO ₂ in mg/100 g Leber	Gefundenes SO ₂ in mg/100 g Leber	Oxydiertes SO ₂ in mg/100 g Leber	Oxydiertes SO ₂ in % d. zuges. SO ₂ -Menge
$1\frac{1}{2}$	16,8	10,5	6,3	37,5
$1\frac{1}{2}$	16,8	10,5°	6,3	37,5
$1\frac{1}{2}$	12,6	6,3	6,3	50
$1\frac{1}{2}$	12,6	6,8°	5,8	46
1	25,2	14,2	11,0	43,7
1	25,2	15,5°	9,7	38,5

x° = Werte der Malachitgrünbestimmung

Bei frischgeschlachteter Rinderleber wurden folgende Werte erhalten: Die zugesetzten Sulfitmengen wurden auf 100,0 g Leber umgerechnet.

Tabelle 6

Inkubationszeit in h	Zugesetztes SO ₂ in mg/100 g Leber	Gefundenes SO ₂ in mg/100 g Leber	Oxydiertes SO ₂ in mg/100 g Leber	Oxydiertes SO ₂ in % d. zuges. SO ₂ -Menge
1	27,2	10,9	16,3	60
1	13,6	5,03	8,57	63

Bei allen Proben wurde das Filtrat des Destillationsrückstandes qualitativ mit Bariumchlorid auf das gebildete Sulfat geprüft. Vor der Denaturierung der Eiweißstoffe war eine Prüfung mit Bariumchlorid nicht möglich.

Menschen-, Rinder- und Schweineblut wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Sulfit zu oxydieren. Die dabei nach der Destillation erhaltenen Rest-SO₂-Mengen waren so gering, daß angenommen werden konnte, daß der Ort der Sulfitoxydation im Organismus das Blut sei. Für 100 ml Blut wurden nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37 °C und anschließender Destillation mit dem Hemmungstest folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle 7

Blutart	Zugesetztes SO ₂ in mg/100 ml Blut	Gefundenes SO ₂ in mg/100 ml Blut	Oxydiertes SO ₂ in mg/100 ml Blut	Oxydiertes SO ₂ in % d. zuges. SO ₂ -Menge
Mensch	34,1	6,83	17,30	50,70
	16,7	0	16,70	100,00
	14,3	0	14,30	100,00
	14,3	2,43	11,87	83,25
	33,4	11,35	22,05	66,10
	40,0	13,60	26,40	66,00
Schwein	50,0	6,60	43,40	86,80
	43,8	5,00	38,80	88,50
	43,8	6,25	37,55	85,70
	50,0	8,80	41,20	82,50
	50,0	7,00	43,00	86,00
	43,8	1,38	42,42	96,60
	43,8	2,50	41,30	94,30
	33,0	1,15	31,85	96,60
Rind	60,0	2,20	57,80	96,40

Fehler: $\pm 1,1$ mg SO₂/100 ml

Da das Blut wesentlich mehr SO₂ zu oxydieren vermochte, als Magen, Darm oder Leber, wurde dem Blut mehr Aufmerksamkeit gewidmet, um die Ursache der Oxydation des Sulfits im Blut zu klären.

Es wurde zunächst das Blutserum für sich allein mit Sulfit versetzt und der Restgehalt an SO₂ bestimmt. Es zeigte sich, daß Blutserum allein SO₂ nicht zu oxydieren vermochte. Für die Sulfitoxydation mußten also die Erythrocyten verantwortlich sein. Es wurde festgestellt, daß die Oxydation von Sulfit im venösen Blut geringer war, als im arteriellen. Es war naheliegend anzunehmen, daß die Sulfitoxydation vom Sauerstoffgehalt des Blutes abhing.

Zum Beweis wurde durch Einleiten von Stadtgas in Rinderblut Kohlenmonoxyd-Hämoglobin (Hb-CO) hergestellt. Die völlige Umwandlung des Oxy-Hämoglobins (Hb-O₂) zum Hb-CO wurde spektralphotometrisch verfolgt. Nach dem Zusatz von Sulfit in Form der Natriummethabisulfatlösung und einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37 °C wurde das Sulfit mit Fuchsin-Aldehyd nach vorausgegangener Destillation bestimmt. Es zeigte sich, daß Hb-CO nicht imstande war, Sulfit zu oxydieren. Es wurde alles Sulfit wiedergefunden. Ein mehrstündigiges Durchleiten von Stickstoff zur Vertreibung des Sauerstoffes aus dem Hb-O₂ brachte den Nachweis, daß auch Hämoglobin nicht in der Lage war, Sulfit zu oxydieren. Die Oxydation des Sulfits erfolgt also von dem an Hb-O₂ gebundenen Sauerstoff.

Die ermittelte Sulfitoxydation durch Blut muß während des Destillationsvorganges erfolgen, bei dem durch die Hitzeeinwirkung und die Ansäuerung das Hb-O₂-Molekül denaturiert wird und der Sauerstoff aus seiner Bindung an das Hämeisen freigesetzt wird.

Zur Erhärtung der Annahme, daß die Oxydation des Sulfits vom Sauerstoffgehalt des Blutes abhängt, wurden in gleichlaufenden Proben der Sauerstoffgehalt des Blutes, die oxydierte Sulfitmengen und der Hb-Gehalt des Blutes bestimmt.

Der Sauerstoffgehalt des Blutes wurde in der Warbung-Apparatur nach der Methode von BARCROFT und HALDANE (27) bestimmt, der Hämoglobingehalt nach der Cyanhämoglobinemethode (28), das Sulfit nach der Destillation mit Fuchsin-Aldehyd (26).

Sämtliche Sauerstoff- und gleichzeitigen Sulfitbestimmungen wurden mit Rinderblut durchgeführt. Die Tabelle 8 gibt die erhaltenen Ergebnisse wieder. Die in Spalte 6 unter I aufgeführten Werte geben die Sulfitmengen wieder, die theoretisch von dem, nach der BARCROFT-HALDANE-Methode ermittelten, Blutsauerstoff oxydiert werden könnten. Es wurde zunächst angenommen, daß ein Teil des bei der Destillation freiwerdenden Sauerstoffs zur Oxydation des Hämoglobins zum Methämoglobin benötigt wird. Die in Spalte 6 unter II aufgeführten Werte geben die theoretisch oxydierbaren Sulfitmengen wieder, nach Abzug des für die Hämoglobinoxydation notwendigen Sauerstoffs.

Tabelle 8

1 Hb-Geh. g/100 ml	2 O ₂ -Geh. mg/100 ml	3 Zuges. SO ₄ in mg/100 ml Blut	4 Gefund. SO ₄ in mg/100 ml Blut	5 mg/100 ml Blut Oxyd. SO ₄ in	6	
					Theoretisch oxydierb. SO ₄ in mg/100 ml I	II
10,68	19,15	40,00	0	40,0	76,5	56,2
10,35	14,60	33,00	0,6	32,40	58,6	38,6
10,35	14,60	50,00	5,04	44,96	58,6	38,6
10,35	14,60	35,70	1,34	34,36	58,6	38,6
12,83	20,60	55,50	2,44	53,06	82,4	58,0
12,83	20,60	55,50	2,11	53,39	82,4	58,0
11,97	20,00	172,50	93,00	79,50	80,0	57,2
11,97	20,00	86,25	15,00	71,25	80,0	57,2
4,68	6,60	55,50	31,00	24,50	26,4	17,4
4,68	6,60	60,00	35,00	25,00	26,4	17,4

Fehler: ± 0,38 mg SO₄/100 ml

Die Annahme erwies sich, wie aus den Ergebnissen zu ersehen ist, als falsch. Es wurde weit mehr Sulfit oxydiert, als theoretisch nach den unter II angegebenen Werten möglich gewesen wäre. Für die Oxydation des Hämoglobins wurde kein Sauerstoff gebraucht.

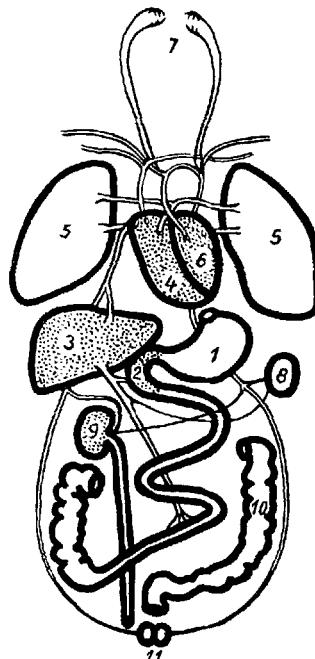


Abb. 3. Weg des Sulfits im Organismus. 1 = Magen, 2 = Duodenum, 3 = Leber, 4 = r. Herzkammer, 5 = Lungen, 6 = l. Herzkammer, 7 = Gehirn, 8 = Milz, 9 = Nieren, 10 = Darm, 11 = Testes. Punktierte Organe = Orte der möglichen Sulfitoxydation.

Eine schematische Darstellung über den möglichen Weg des Sulfits im Organismus gibt Abb. 3. Das Sulfit kann nach der Resorption im Duodenum oder Dünndarm von der Pfortader zur Leber transportiert werden. Falls hier keine vollständige Oxydation stattfindet, gelangt das Sulfit auf dem Blutweg in die einzelnen Organe und zwar in der Reihenfolge der Numerierung. Die Organe, in denen eine Sulfitoxydation stattfinden kann, wurden punktiert gezeichnet.

Zusammenfassung

Die Bestimmung der schwefligen Säure in biologischen Flüssigkeiten ist schwierig. Eine direkte Bestimmung kann in vielen Fällen nicht durchgeführt werden, und eine Isolierung schafft Veränderungen der untersuchten Probe, bei denen Reaktionen eintreten können, die bei physiologischen Bedingungen nicht möglich sind.

Es wurde zunächst nach einer Methode gesucht, die es erlaubte, das Sulfit ohne vorausgehende Isolierung direkt zu bestimmen.

Der Hemmungstest, bei dem die durch Lactat-Dehydrogenase katalysierte Brenztraubensäurehydrierung von Sulfit gehemmt wurde (21), wurde auf die Möglichkeit einer direkten, quantitativen Sulfitbestimmung untersucht. Die Hemmung konnte nur in einem

engen Bereich von 0,5–5,0 γ SO₂/2,0 ml Testlösung zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden. Die Grenzen der bestimmmbaren Konzentrationen an SO₂ werden durch die einzupipettierenden Mengen gegeben und liegen zwischen 3 und 200 ppm. Aus der statistischen Fehlerbereiche wurde eine Empfindlichkeit von 0,3 γ SO₂ pro Testansatz berechnet. Der Fehler verringert sich also mit steigenden Konzentrationen, wird aber durch das einzupipettierende kleine Volumen oder durch eine Verdünnung wieder ausgeglichen. Die Sulfithemmung ist stark abhängig von der DPNH-Lösung, deren Stabilität rasch abnimmt. Für jede Sulfitbestimmung muß daher gleichzeitig eine neue Eichkurve mit Lösungen von bekanntem Sulfitgehalt aufgenommen werden. Dies verzögert die ansonsten schnelle und bequeme Sulfitbestimmung. Für Proben verschiedenen Gehaltes, die zu verschiedenen Zeiten bestimmt wurden, wurde daher ebenfalls die Standardabweichung berechnet und deren Fehler als allgemeiner Fehler der Methode aufgenommen. Der Fehler wurde in ppm ausgedrückt und betrug ± 11,15 ppm SO₂ = ± 1,115 mg/100 ml. In stark gefärbten und proteinhaltigen Lösungen war die direkte Bestimmung nicht mehr möglich. Das Sulfit wurde durch Destillation aus den angesäuerten Proben isoliert. Für das isolierte SO₂ konnte auch eine Methode benutzt werden, die eine geringere Fehlerbreite als die enzymatische Bestimmung besaß. Die Bestimmung mit Fuchsin und Formaldehyd nach der Methode von WEST und GAEKE (26) wurde auf ihre Brauchbarkeit untersucht. Die Empfindlichkeit lag bei 1 γ SO₂/10,0 ml. Die Fehlergrenze für Proben verschiedenen Gehaltes wurde mit ± 3,8 ppm SO₂ = ± 0,38 mg/100,0 ml bestimmt.

Je 100 ml Speichel von 6 Versuchspersonen hatten nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37 °C 0,88–2,76 mg SO₂ oxydiert. Die oxydierten Mengen waren von der Art, aber nicht vom pH-Wert des Speichels abhängig.

Von den untersuchten Magensaften zeigten alle alkalischen und ein Teil der sauren eine Sulfitoxydation. Die Oxydation erfolgte spontan. 100 ml alkalischer Magensaft oxydierten durchschnittlich 5,10 mg SO₂.

Von 100 ml A-Galle wurden durchschnittlich 5,6 mg SO₂ oxydiert. 100 ml B-Galle konnten durchschnittlich 7,45 mg SO₂ oxydieren, so daß von 100 ml Duodenalsaft 5 bis 7,5 mg SO₂ oxydiert werden können. Es wird angenommen, daß es sich bei der Oxydation des Sulfits um eine Autoxydation handelt. Diese Autoxydation muß aber vom Magen- und Duodenalsaft katalysiert werden, da eine alkalische Lösung von Biliverdin und Bilirubin keine Sulfitoxydation zeigte, auch nicht nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden.

Ein Leberhomogenisat zeigte eine Sulfitoxydation, die, da es sich um einheitliches Material handelte, bei gleicher Lebermenge mit doppelter Sulfitkonzentration um das Doppelte zunahm. Ob es sich bei der Oxydation des Sulfits in den Leberhomogenisaten um eine Oxydation handelte, die erst bei der Destillation stattfand, oder um eine anaerobe bei 37 °C, konnte nicht entschieden werden. Von 100,0 g Leber wurden 40–60% des zugesetzten Sulfits oxydiert.

Die vom Blut oxydierten Mengen Sulfit wurden von dem Sauerstoff oxydiert, der bei der Destillation durch Denaturierung des Hämoglobinmoleküls in Freiheit gesetzt wurde. Der freiwerdende Sauerstoff setzte sich quantitativ mit dem Sulfit um.

Literatur

1. LANG, K., Schriftenreihe d. Bundes f. Lebensmittelrecht u. Lebensmittelkunde Heft 31, Hamburg-Berlin-Düsseldorf (1960). — 2. JACOBY, C. und H. WALBAUM, Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 54, 421 (1906). — 3. LOCKETT, M. F. and I. L. NATOFF, J. Pharmacy Pharmacol. 12, 488 (1960). — 4. SONNTAG, G., Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt 21, 285 (1904). — 5. FRANZ, F. und G. SONNTAG, Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt 28, 225 (1908). — 6. BAGHAT, B. and M. F. LOCKETT, J. Pharmacy Pharmacol. 12, 690 (1960). — 7. SORBO, B. H., Biochim. Biophys. Acta 24, 324 (1957). — 8. SINGER, T. P. and E. B. KEARNEY, Biochim. and Biophys. Acta 14, 570 (1954). — 9. HEIMBERG, M., I. FRIDOVICH und PH. HANDLER, J. Biol. Chem. 204, 913 (1953). — 10. FRIDOVICH, I. and PH. HANDLER, Fed. Proceed. 13, 212 (1954). — 11. FRI-

DOVICH, I. and PH. HANDLER, Feed. Proceed. **14**, 214 (1955). — 12. FRIDOVICH, I. and PH. HANDLER, J. Biol. Chem. **221**, 323 (1956). — 13. FRIDOVICH, I. and PH. HANDLER, J. Biol. Chem. **223**, 321 (1956). — 14. BOYER, P. D., J. Amer. Chem. Soc. **76**, 4331 (1954). — 15. FRIDOVICH, I. and PH. HANDLER, J. Biol. Chem. **228**, 67 (1957). — 16. FRIDOVICH, I. and PH. HANDLER, J. Biol. Chem. **233**, 1581 (1958). — 17. FRIDOVICH, I. and PH. HANDLER, J. Biol. Chem. **236**, 1836 (1961). — 18. MACLEOD, R. M., J. Biol. Chem. **236**, 1841 (1961). — 19. SCHNEIDER, W. C. und G. H. HOGEBOOM, J. Biol. Chem. **183**, 123 (1950) zit. nach (31). — 20. MACLEOD, R. M., I. FRIDOVICH und PH. HANDLER, J. Biol. Chem. **236**, 1847 (1961). — 21. PFLEIDERER, G., D. JECKEL und TH. WIELAND, Biochem. Z. **328**, 187 (1956). — 22. BERGMAYER, H. U., Methoden der enzymatischen Analyse. 1. Aufl. (Weinheim 1962). — 23. STRAUB, F. B., Biochem. J. **34**, 483 (1940) und Z. physiol. Chemie **275**, 63 (1942). — 24. BEISENHERZ, G., T. H. BÜCHER, J. H. BOLTZE, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE und G. PFLEIDERER, Z. Naturforschg. **8b**, 555 (1953). — 25. RICHTER, I. und L. KNY, ZUL **106**, 337 (1957). — 26. WEST, PH. W. und G. C. GAEKE, Analyt. Chemistry **28**, 1816 (1956). — 27. BAMANN, E. und K. MYRBACK, Methoden d. Fermentforschung. Bd. 1, 985 (Leipzig 1941). — 28. BETKE, K. und W. SAVELSBERG, Biochem. Z. **320**, 431 (1950).

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. W. DIEMAIR, 6 Frankfurt a. M., Georg-Voigtstr. 16

Aus dem Universitäts-Institut für Lebensmittelchemie, Frankfurt a. M.

Das Verhalten der schwefligen Säure in biologischen Flüssigkeiten und die Möglichkeiten zu ihrer Bestimmung

2. Mitteilung

Von W. DIEMAIR und I. ENGELHARDT

Mit 6 Abbildungen und 5 Tabellen

(Eingegangen am 2. Februar 1965)

Untersuchung von Blutspektren

In einer vorausgegangenen Mitteilung wurde darüber berichtet, daß eine Oxydation des Sulfits im Blut nur vom Sauerstoff abhängig sei, der bei der Destillation von seiner Bindung an das Hämoglobin in Freiheit gesetzt wird. Es war nun zu klären, ob eine Sulfitoxydation auch unter normalen Bedingungen stattfinden kann. Eine Reduktion des Oxyhämoglobins mit Sulfit ist möglich. So wurde bei der spektralphotometrischen Bestimmung von Blutsauerstoff das Blut reduziert mit 2% seines Volumens einer gesättigten Natriumhydrogensulfatlösung (1). Die Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff ist wahrscheinlich erst durch größere Sulfitmengen aufzuheben.

Bei der Untersuchung der Blutspektren wurden einmal die Sulfitmengen ermittelt, die notwendig waren, um das Oxyhämoglobin zu reduzieren und zum anderen, ob das Sulfit in der Lage war, irgendwelche spektralen Veränderungen hervorzurufen.