

Research at the Pharmacological Institute of the German University, Prague

## **About the oxidation of methyl and ethyl alcohol within the animal body**

by private lecturer Dr. Julius Pohl,  
assistant professor at the institute

(contains 2 figures)

Presently studies on the metabolism of ethyl alcohol within an organism show that 90-96% of the alcohol is oxidized within the organism <sup>1)</sup> and a small proportion is excreted unchanged via respiration, perspiration and urine. But the knowledge about the place and intermediates of this oxidation is still unsatisfactory.

People tend to equate the *in vitro* alcohol oxidation (via aldehyde to acid) with what happens in the animal body. However, the chemical experience shows, that the nature of the intermediate(s) and the yield of end product(s) varies with the organism studied. The animal has a peculiar oxidation ability: some substances are oxidized almost completely whereas for others the oxidation might be restricted. The different stages of a substance circulating in the animal body are far away from being certain. Every single case needs to be verified with an adequate experiment.

According to LIEBIG ethyl alcohol oxidizes first to aldehyde, followed by lactic acid, oxalic acid, formic acid and carbonic acid. DUCHEK and his scholar KRETSCHY declare that after ethyl alcohol administration aldehyde was found not only in the stomach, but also in blood and liver distillates by simple detection with silver nitrate. BUCHHEIM, MASING, SETSCHENOW, LALLEMAND, PERRIN and DUROY contradict those findings. A recent observation by ALBERTONI <sup>2)</sup> (given it can be confirmed) is pointing to a more complicated way of alcohol oxidation than previously thought. He could show, that even small amounts of acetaldehyde (e.g. 1mL diluted solution, taken via mouth or nose) would be secreted unchanged via the lung or kidney. But he was never able to detect aldehyde in the expiratory air or urine after application of alcohol. ALBERTONI <sup>3)</sup> concluded that an oxidation of alcohol with aldehyde as intermediate is unlikely, but he did not express an idea how else the oxidation would proceed. Because these findings were not gained by quantitative analysis they do not prove the complete inability of the animal body to oxidize aldehyde.

For the extraordinary interest of alcohol oxidation within an organism I have chosen methyl alcohol – the simplest alcohol – for several experiments. I would expect the results to be useful for the fate of ethyl alcohol as well.

### ***I. Physiological effects of methyl alcohol***

To begin with I would like to outline the common effects of an intoxication with methyl alcohol. They are somewhat different to the ethyl alcohol poisoning. If a strong dog is given methyl alcohol in sufficient amounts and appropriate dilution (about 40-50 mL methanol per 8-10 kg dog) in the beginning the effects are similar to an intoxication with ethyl alcohol. After some time the dog exhibits lack of coordination which culminates in staggering/delirium with increasing urge to move. After that the animal becomes somnolent and finally sleeps for hours. In contrast to ethyl alcohol poisoning where the animal seems to awake in its normal condition this

is not the case for intoxications with methyl alcohol. Here the deep sleep continues to the next day (with short breaks) and even the day after the animal is reluctant to move, lazy, extremely tired and refuses to eat. Usually only after 3 or 4 days after the intoxication it demonstrates its normal liveliness. In case of repeated or higher methanol doses the somnolence increased until the animal died about 3 or 4 days later (in a warm room next to the fire) of respiratory paralysis. Even rabbits – usually less suitable for studies on the effect of alcohol – show after appropriate doses (20 g) this late and long lasting period of methanol influence often finished by the death of the animal.

Likewise the chronic intoxication with methyl alcohol is very different from poisoning with other alcohols including ethyl alcohol. During my unsuccessful experiments to induce liver cirrhosis I learned that you could feed dogs (rabbits not as good) over months up to a year on ethyl alcohol, isobutyl alcohol or amyl alcohol without negative effects on the animal. As an example: a young dog (1190 g) received 752 mL commercially available (diluted) amyl alcohol over a period of 220 days. Despite the many intoxications its body weight increased during this time to 4700 g. In the beginning 1 mL was enough for the animal to get drunk, but after being accustomed to the amyl alcohol only 5 mL had the same effect. The dissection did not reveal changes in the parenchymatous organs of the lower body. Even the microscopic analysis of preserved organ pieces (Flemming's solution and alcohol) did not show differences to normal conditions.

But during administration of methyl alcohol I was never able to keep the dog alive for more than a few weeks, even though giving doses of not more than 15-20 mL and two-day-intervals. Usually the animal would lay almost unconscious for several days, rarely awake. They did not eat and even after having stopped the methanol application they simply died.

The only regular finding during the dissection was an extremely adipose liver. This is remarkable not only because of the fast development but also the regularity. The details are in very good accordance to the results of KAHLDEN<sup>4)</sup>. To get an idea of the extent of the fatty degeneration I once retrieved an ether extract from a dried liver (100°C) and compared it to the extract of a liver from a control dog feeding on the same food. The ether residue of the reference dog represents 16.6%. For the methyl alcohol animal the values of two samples were 37.9 and 37.5% - twice as much. For every experiment with alcohol the protein precipitation ability has to be considered. Own experiments regarding the precipitation limit of methyl and ethyl alcohol using egg white reveal a threshold concentration of about 20% to induce protein precipitation.

## ***II. Fate of methyl alcohol within the body***

During my first experiments on the fate of methyl alcohol in the body I wanted to find out if there are changes in the urinary composition after administration of methanol: either the occurrence of oxidation products or methyl alcohol itself. To detect methanol in urine the samples are distilled under alkaline conditions. Sulfuric acid was added, and then distilled another time with potassium carbonate. The boiling point of the distillate was determined. After oxidation with chromic acid mixture, the volatile products were analyzed for formic acid. Methyl alcohol was not found unchanged in urine. But there was a considerable increase in acidity of the acidified urine distillates (phosphoric acid). These results were followed by a qualitative and quantitative analysis of the causal acid. For obvious reasons this volatile acid was

assumed to be formic acid. Every single qualitative reaction could prove this assumption: reduction of silver nitrate, mercury oxide (mercurius nitricus oxydulatus) xxx and mercury chloride as well as the color reaction with iron chloride.

For quantitative determination of formate the reduction of mercury chloride to calomel was used. This method was applied in technology for a long time and just recently recommended by SCALA<sup>5)</sup>. Nevertheless its reliability for urinary analysis needed to be verified.

To determine formate the solution was neutralized or adjusted to be slightly acidic with acetic acid. In a water bath it was then boiled with the same volume of cold saturated sublimate solution xxx. After cooling for a few hours the calomel precipitation was filtered off, rinsed (chlorine free), dried at 100°C and weighed until constant. 1 g calomel corresponds to 0.09756 g formic acid or the calomel number multiplied by 0.1442 gives the amount of sodium formate. All results of this study are converted from calomel to sodium formate.

To prove the applicability of this method in general and especially for urine a few tests should be mentioned: After acidification with 50 mL 20% phosphoric acid<sup>6)</sup> fatty acids were distilled off until no further acidic reaction of the distillate. Usually 8 - 12 hours were needed, during animal experiments often continuous distillation for several days. The combined distillates were neutralized with iron free leach xxx or sodium carbonate and then evaporated in a sand bath. If precipitation occurred, the distillate was then filtered and a proportion of was used to analyze for formate.

### Experiment I

Analysis of sodium formate

target value = 0.3750 g

actual value = 0.3754 g = 100.1%

### Experiment II

A) 100 mL urine + 0.5779 g formate	yield	4.1209 g Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
B) 100 mL urine (blank)	yield	0.0980 g Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
	difference A-B	4.0229 g Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
	equivalent to	0.5801 g sodium formate
		= 100.3%

### Experiment III

A) 70 mL urine + 0.2421 g formate	yield	1.7229 g Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
B) 70 mL urine (blank)	yield	0.0763 g Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
	difference A-B	1.6466 g Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
	equivalent to	0.24068 g sodium formate
		= 99.4%

These first results support the applicability of the method for urinary analysis of formate.

### *Intoxication experiments*

Canine urine always contains small amounts of formic acid. These plus the acidity were analyzed before intoxication. Blank values should then be subtracted of the formate amounts found in the urine after application of methanol. Under normal circumstances the dogs excreted less than 0.01 g formate per day.

### Experiment IV

Dog (body weight: 8120 g)

Date	Urine [mL]	Acidity of the distillate [mL 0.1N NaOH]	Formate [g]	Notes
15. Dec.	230	4.6	failed	7 pm: 60 mL MeOH
15. Dec. 7.30 pm	133	39.6	0.055	-
16. Dec.	195	78.4	0.354	The whole day animal lethargic and anorexic.
17. Dec.	425	434.1	0.933	-
18. Dec.	225	110.0	0.684	-
19. + 20. Dec.	364	190	0.441	-
21. Dec.	195	6.6	0.007	-

Body weight of the animal on 21. Dec.: 7280 g.

### Experiment V

Dog (same as in Experiment IV)

Date	Urine [mL]	Acidity of the distillate [mL 0.1N NaOH]	Formate [g]	Notes
9. Jan.	215	6.3	0.0041	12 pm: 48 mL MeOH
10. Jan.	290	-	0.0479	-
11. Jan.	118	28.6	0.0916	-
12. Jan.	152	90.4	0.3247	Vomitus in the evening, no feed intake
13. Jan.	158	-	0.3989	-

Animal somnolent, 14 respirations per minute; death by respiratory paralysis at 11 am. Final body weight: 6450 g. The autopsy reveals nothing abnormal apart from a considerable adiposis of the liver (microscopic analysis).

### Experiment VI

Dog (body weight: 8200 g)

Date	Notes
------	-------

6.	300 mL urine with 0.0286 g formate 10 am: 10 mL MeOH, no sign of anesthesia
7.	182 mL urine with 0.0065 g formate
8.	300 mL urine with 0.2932 g formate
9	305 mL urine with 0.008 g formate

### Experiment VII

Rabbit (body weight: 2370 g)

Date	Notes
9.	61 mL urine with 0.0082 g formate 7 pm: 16 mL MeOH in 40 mL H <sub>2</sub> O, no anesthesia
10.	85 mL urine with 0.0108 g formate
11. + 12.	75 mL urine with 0.0128 g formate
13.	25 mL MeOH
14.	Paresis of hind legs 161 mL urine with 0.0722 g formate

The preceding experiments reveal – especially for dogs - over days after the methanol intoxication first a gradual increase, followed by a decrease of formate excretion in urine. During experiment IV the maximum of formate excretion only occurred 4 days after application of methanol. Furthermore, experiment VI demonstrates, that this is similar for small amounts of methyl alcohol without causing anesthesia or intestinal irritations. The maximum of formate excretion occurs between 24 and 48 hours after alcohol application.

The experiments require discussions and follow-ups in different directions.

Above all should be the question from the beginning about the alcohol oxidation. The test indicate an excretion of formic acid after intake of methyl alcohol. Would ethyl alcohol convert to acetic acid? Or would any protracted anesthesia lead to formate excretion regardless of the alcohol applied? In parts the above experiments answer those questions. Even small amounts of methyl alcohol induced (minor) formate excretion without causing anesthesia. The following tests were performed for further understanding.

### Experiment VIII

Dog (body weight: 6650 g)

ethyl alcohol

Date	Urine [mL]	Acidity of the distillate [mL 0.1N NaOH]	Formate [g]	Notes
5. Feb.	310	20.1	0.007	
6. Feb.				20 mL EtOH in H <sub>2</sub> O
7. Feb.	492	21.8	n.d.	

Because of the minimal difference in acidity before and after ethanol application formate was waived.

A second experiment with ethanol using a different animal lead to the same negative result.

### Experiment IX

Dog (same as in Experiment VIII)

Date	Urine [mL]	Acidity of the distillate [mL 0.1N NaOH]	Notes
13. Feb.	227	9.0	
13. Feb.			morning: 10 mL paraldehyde + 60 mL H <sub>2</sub> O 1/2 hour later: animal asleep 4 pm: animal still asleep
13. Feb.	65	8.2	urine smells of paraldehyde

The results of the experiment with ethyl alcohol are in accordance with other experiences about the oxidation of ethanol. Ethyl alcohol is burned up completely without traces of the intermediate acid in urine. Recently ZUNTZ and MALLEVRE <sup>7)</sup> could again show the easy oxidability of acetate i.v. Nevertheless I satisfied myself with the following test: 2.7 g sodium acetate were applied. Only 0.003 g of it were found in the urine the following day, measured by a slight increase in acidity of the distillate. Therefore the oxidation of ethyl and methyl alcohol in the body is different. Methanol is not oxidized completely to carbon dioxide and the excretion of the intermediate formic acid is protracted. There is probably a connection between these chemical differences and the distinctness in the duration of the anesthesia. So what is a possible explanation for the protracted excretion of formate? It's probably foremost due to its peculiarity concerning oxidability and excretion. Regarding this matter the following information can be found in scientific literature. According to GREHANT and QUINQUAUD <sup>8)</sup> formic acid is excreted unchanged regardless of the application method. This is in agreement with the results of SCHOTTEN <sup>9)</sup>, who has found up to 26% of the orally applied formate in urine. On the contrary the research of PELLACANI <sup>10)</sup> indicates a degradation of formate within the body. Of 4 g orally given formate only 0.56 g were detected in the urine over the next two days. The decide for myself I conducted the following experiments:

### Experiment X

Dog (body weight: 7900 g)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
8.	135	0.010	
8.			1.0304 g formate (dried at 100°C) + 30 mL H <sub>2</sub> O
9. + 10.	225	0.071	
10.	95	0.019	
12. Dec.	-	0.008	

Given the daily formate excretion is about 0.01 g only 0.06 g (5.8%) more were found in the urine after formate administration.

### Experiment XI

Dog (body weight: 7750 g)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
2. Feb.	120	0.0071	
2. Feb.			morning: 1.2532 g formate dissolved in water administered by gavage
2. Feb.	71	0.1649	
3. + 4. Feb.	172	0.0834	
5. Feb.	175	very low	not weighed because of impurities

Given the daily formate excretion is about 0.007 g only 0.2341 g (18%) more were excreted during the next three days.

Taking into account the results of research mentioned earlier I conclude the following: Small amounts of formate (less than 1g per 7 kg body weight) will be oxidized completely within the canine organism. Any surplus will be (partly) excreted unchanged. By no means should the protracted formate excretion be explained by any peculiarity of the formate itself, since it – like other salts - has left the body within 24 hours after internal administration.

However, it is still possible that formate is retained in situ – perhaps in a special form – and is then slowly released into the circuit. Because of this assumption I conducted the following experiment trying to force a flow through the body to eliminate more of the existing formate.

### Experiment XII

Dog (body weight: 6400 g)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
21. Mar.	170	0.0096	
21. Mar.			7:30pm: 30 mL MeOH + 80 mL H <sub>2</sub> O administered by gavage
22. Mar.	207	0.0108	morning urine
22. Mar.			The animal is now clamped. Through the V. jug. 500 mL 1% NaCl are injected followed by 400 mL 2% NaCl solution (warm).
22. Mar.	1130	0.3395	urine collection until 8pm
23. Mar.	230	0.8752	
24. Mar.	130	0.3460	
25. Mar.	166	0.0626	
26. Mar.	180	0.0122	

The higher flux increased the elimination of formate, but the concentration is similar to the values before the flow through. Only at the next two days high amounts of formate were excreted in small volumes of urine. The hypothesis of formate being retained *in situ* is not supported by this experiment. But still formic acid could be bound within the organism in a way that a simple flow through would not effect it. Therefore organs were taken from an animal at the maximum of formate excretion and the formate content was determined.

### Experiment XIII

Animal over 7 kg body weight

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
1. Jun.	570	0.0106	
1. Jun.			noon: 25 mL MeOH + 150 mL H <sub>2</sub> O
2. Jun.	400		
3. Jun.	520		
3. Jun.	122	0.2442	afternoon urine

The animal is killed by exsanguinations. The minced organs were mixed with physiological saline and 50 mL phosphoric acid were added. The distillation results were as follows:

Amount	Organ	Formate [g]
100 mL	blood	0.0004
100 g	liver	-
100 g	muscle	0.0005
27 g	kidney	0.0345
50 g	lung	0.00044

According to these results retention or storage of formate within the animal body is out of question.

Thus, the protracted excretion of formate has to be caused by retention and a gradual oxidation of methyl alcohol itself or its derivative within the body. This aspect leads to two sets of experiments:

1. Analysis of methyl alcohol and/or formaldehyde within organs of animals intoxicated with methanol.
2. Gain knowledge about the chemical and physiological effects of an intoxication with formaldehyde, since it is likely to be an intermediate during methanol poisoning.

The determination of methyl alcohol is much more difficult than the one of ethyl alcohol, especially taking into account the small amounts needed in these experiments. The organ was first distilled under neutral or slightly alkaline condition, followed by another distillation with sulfuric acid and potassium carbonate (to withhold water). If in the end with fractional distillation a neutral distillate with a characteristic smell was yielded at 66°C or 66.5°C it was a strong indication for its identification. There always has to be a subsequent oxidation to formic acid.



Numerous other organic molecules including volatile urinary components could be oxidized to formate as well.

Despite the effort I was not able to detect methyl alcohol in the distillates of the animal organs taken at the time of the expected main formate excretion (2 or 3 days after methanol administration). With regard to formaldehyde detection (with fuchsin and sulfurous acid) I was not luckier. Only one experiment pointed to a minor formaldehyde formation.

#### Experiment XIV

In the morning of the 17. a dog (5 kg) is given 30 mL methyl alcohol in 120 mL water. The animal vomits half an hour after administration. In the afternoon a second dose of 15 mL methyl alcohol in 50 mL water is applied. After a few minutes the animal reacts with staggering. On the 18. the dog gives a sick appearance. It crouches down in the kennel, reacts to calls and touches only by lifting the head without getting up. In the morning of the 19. the dog dies by exsanguinations.

Organ	Distillation	Fuchsin reaction
blood	direct	no
blood	with diluted sulfuric acid	strong
liver	direct	no
liver	with diluted sulfuric acid	weak
muscle	direct	very strong

A parallel experiment with an untreated animal produced similar results for blood and liver. On the contrast the test done with muscle resulted in a much weaker fuchsin reaction. Therefore, the only indication for formaldehyde in the intoxicated animal is the intensity of the reaction. The response of fuchsin to formaldehyde is strong even at a concentration of 1:1000. Furthermore the strong reaction only occurred in the beginning of the distillation and later ceased completely. Hence, the formaldehyde concentration in the muscle of the intoxicated animal must have been minor and it is unlikely to be an explanation for the protracted excretion of formate <sup>12)</sup>.

Yet it was not proven that the administration of formaldehyde leads to the excretion of formate. The next experiment was carried out.

There was a chance of unchanged aldehyde present in urine and distillate, that could have been oxidized during evaporation under alkaline conditions or be converted to reducing condensation products. I neutralized the urine distillates with calcium carbonate solution and evaporated to dryness under slightly alkaline conditions. As reference I used two equal parts of normal canine urine. One half was minced with a few drops of formaldehyde. The above described method resulted in almost identical formate values (difference about 0.02 mg)

#### Experiment XV

Dog (body weight: 4400 g)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
7.	130	0.0022	

7. morning			4 mL formaldehyde solution (40%) + 40 mL NaCl solution (0.6%) subcutaneous administration
7. afternoon	75	0.0357	
8., 9., 10.	75	0.0312	
11.	95	0.002	

The results prove the possibility of aldehyde oxidation within the animal body. But first, the irritating properties of aldehyde only allow for small doses applied subcutaneous. And second, the determination of unchanged aldehyde in urine was yet to be done. Because of these two reasons I decided to use sodium hydroxymethane sulfonate (HO-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>Na, a.k.a. aldehyde (sodium) sulfite, sodium formaldehyde bisulfite) instead of the pure aldehyde<sup>13)</sup>. Sodium hydroxymethane sulfonate is not irritating and eliminates formaldehyde in alkaline solution. It is not easy to synthesize this compound pure enough for analysis. Not even by following the recent instructions of KRAUT and ESCHWEILER<sup>14)</sup>. Prof. HOFMEISTER proposed to use bisulfite instead of pyrosulfite – with great success. The sodium content of the obtained formaldehyde sodium sulfite was in accordance with the chemical formula above. It was used in the following experiment.

### Experiment XVI

Dog (body weight: 6600 g)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
5.	137	0.0173	
7. afternoon			5 g aldehyde sodium sulfite in 10% solution subcutaneous administration
6., 7.	250	0.1889	
8.	315	0.0577	
9.	467	0.0256	

No unusual aldehyde reaction (Fuchsin and sulfurous acid with silver-ammonia complex) was observed for a) the urine of day 6 and 7 and b) urine from a second experiment in which 2 g of aldehyde sulfite were administered subcutaneous to the animal. The expected value of formate in the urine of Experiment XVI was 2.5 g (assuming that all formaldehyde was converted to formate). The results show an increase of 0.2 g formate. The animal never exhibited signs of aldehyde intoxication. Furthermore the expiratory air did not smell like aldehyde – a results found if aldehyde is given directly subcutaneous. The results lead to the conclusion that aldehyde was oxidized to a greater extent than in the preceding experiments. These experiments can be seen as proof for the fact that aldehyde oxidation occurs within the animal body.

Another possibility needed to be explored. If very large amounts of bisulfite were available in the body aldehyde (directly applied or formed from methyl alcohol) could be bound in a salt like compound. Changes in the course of oxidation (time,

qualitative and quantitative) would be possible. From this point of view the next experiments were carried out.

### Experiment XVII

Dog (body weight: 9800 g)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
29. Feb.	308	0.044	
			application of 3g sodium bisulfite (aqueous solution) no aldehydes xxx in the urine
1. Mar.	370	failed	urine mixed with excrements determination of formate failed because of dark coloring of the small amount of calomel (Hg or HgS?)
			12 pm: 3 g neutralized bisulfite in water subcutaneous administration directly followed by 30 mL methyl alcohol + 110 mL water per os
2. + 3. Mar.	672	3.440	
4. Mar.	312	1.284	
5. Mar.	610	0.896	sum 2. to 5. Mar. = 5.620 g formate
6. Mar.	162	0.033	

### Experiment XVIII

Dog (body weight: 6500 g)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
7. afternoon	135	0.0013	
			4 pm: 3g sodium bisulfite, subcutaneous
8.	265	0.6344	
9.	300	0.5210	
10.	280	2.6910	
11.	150	1.6987	
12.	190	0.0713	sum 8. to 12. = 5.5451 g

These two experiences show the highest formate values of the whole study. In a similar third experiment 2 g bisulfite were administered. The formate found was in the normal range. But since the animal suffered from diarrhea this result does not have to be contradictory to the two before. Bisulfite did not lead to increased diuresis. The statement of the possible influence of bisulfite on the formate excretion should be enough at this point. Interpretation would only be based on hypothesis.

The next experiment was carried out to determine the course of the oxidation after intravenous administration of methyl alcohol.

## Experiment XIX

Dog (female, body weight: 5900 g)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
10. Apr.	340	0.0134	
11. Apr.			5 pm: 20 mL methyl alcohol + 80 mL water injection into Vena jugularis (30 minutes) After release minor coordinative problems, stagger, fully conscious 1/2 hour later animal normal, eats
12. Apr.	160	0.1490	
13. Apr.	150	1.0210	
14. Apr.	308	2.1152	
15. Apr.	228	0.8700	
16. Apr.	300	0.4225	

There is no difference in the oxidation of methanol and subsequent excretion of formate regardless of the method of application. After direct administration into the blood – basically a flooding of the organism with methyl alcohol – the same results were found compared to oral application.

The next experiment shows briefly that the oxidation of methanol in human is similar to the one found within the animal body.

## Experiment XX

Human (31 years, body weight: 62 kg)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
			10 am: 25 mL methyl alcohol + 125 mL water
Day 1	1620	0.0531	
Day 2	1295	0.6197	
Day 3	1480	0.1323	
Day 4	1220	0.0431	

Concerning the question of methanol oxidation the results of all of the described experiments can be summarized as follows: A considerable amount of the administered methyl alcohol is oxidized to formate and excreted with urine. The intoxication lasts for several days, the intensity first increasing and then slowly decreasing and corresponds to a protracted formate excretion. Further questions still need to be answered: Is every alcohol molecule converted to acid before oxidized completely to carbon dioxide? Or is part of the administered alcohol bound in another way? Or are intermediates formed that are then not oxidized further? The formation of glucuronic acid was not observed after methanol intake.

### ***III. Physiological effects of formaldehyde***

Recently ALBERTONI stimulated the discussion whether or not methyl and ethyl alcohol are oxidized to the acid via the aldehyde. Regarding this question and other clues it seemed important to compare the effects of methanol vs. formaldehyde intoxication. The results of my experiments in that direction show that at no stage and in no way of administration of formaldehyde the effects were similar to a poisoning with methyl alcohol. The general effects of formaldehyde have not been studied yet. The qualitative results of my experiments resemble the ones found by ALBERTONI<sup>15)</sup> regarding acetaldehyde. Both aldehydes – even in small doses lead to salivation, vomiting, narcosis, coma and death. The autopsy shows a serious gastroenteritis probably caused by the local irritating effects of aldehydes. After subcutaneous or intravenous application the effect on respiration is most remarkable. As an example sections of the respiration curves are rendered. The dog received 3 mL of formaldehyde solution in water (10%/90% xxx) over a period of half an hour. Figure one shows the type of respiration before and figure two after injection (same heart rate).

Fig. 1. normal type of respiration

Fig. 2. respiration after subcutaneous formaldehyde injection

A few seconds after the injection usually an increase in respiration occurs with a higher respiratory volume. In some cases the frequency is soon down to normal levels but sometimes it leads to a continuous, accelerated and deepened type of respiration as shown in the fig. 2. For dogs there is almost no effect of formaldehyde on the blood pressure. During periods of heavy breathing the blood pressure is only very slightly increased. In contrast to that after formaldehyde injection rabbits exhibit a slower heart rate in the beginning together with an increased blood pressure that then remains constant. The respiration is slowed down and the animals die due to respiratory paralysis.

### ***IV. Oxidation of other compounds containing methyl groups***

The preceding experiments showed a lower ability to be oxidized of methyl alcohol compared to ethyl alcohol. At this point it can be explained by the ability to oxidize acetic acid in unlimited amounts but the capacity to oxidize formate is only limited. It seemed logical to study this reaction also on other aliphatic fatty acids. If during the metabolism methyl or formal groups were eliminated a high concentration of urinary formate is expected after administration. To avoid hasty judgments based on random similarities it would be necessary to analyze many many bodies. I have only studied acetone, methyl acetate and methyl amine.

#### **Experiment XXI xxx**

Dog (body weight: 5000 g)

Date	Urine [mL]	Acidity of the distillate [mL 0.1N NaOH]	Formate [g]	Notes

7. Feb.	170	3.4	0.0027	
				37 mL acetone (pure, diluted), per gavage, inhibition of oesophagus; first increased activity, staggering, shortly after: asleep
8. Feb.	110	7.1	0.0217	-
9. Feb.	190	6.9		-

### Experiment XXII

Dog (body weight: 9800 g)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
19.	195	0.0110	
			10:45 am: 20 mL acetone (pure)
20.	317	0.0219	
21.	377	0.0123	

### Experiment XXIII

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
Day 1	212	0.00932	
			10 mL methyl acetate + 50 mL water animal soon falls asleep, back to lively in the afternoon
Day 2	270	0.2520	
Day 3	170	0.2344	
Day 4	150	0.0064	

### Experiment XXIV

Dog (body weight: 5000 g)

Date	Urine [mL]	Formate [g]	Notes
Day 1	210	0.00648	
			12 pm: 2 g methyl amine HCl in water per os
Day 2	196	0.996	
Day 3	250	0.0152	
Day 4	345	0.0025	

There is only a minimal formate excretion after acetone administration, whereas methyl acetate and methyl amine lead to relatively high amounts. The results indicate a formation of formate only after application of methylated derivatives: methyl alcohol, methyl ester, formaldehyde, oxymethane sulfonic acid xxx, methyl amine. If the methyl group is bound to a carbon atom like in the case of ethyl alcohol or acetone less or no formate is found in urine. This is in accordance to the fact that carbohydrates, fats and proteins in our food do not lead to formate excretion. The oxidation of carbon chains most likely is not done step by step by simply removing one carbon atom after the other. In that case every CH<sub>2</sub>- and CH<sub>3</sub>-group would then be converted to formic acid and later oxidized to carbonic acid, and large quantities of formate should be found in urine.

### *V. Location of oxidation within the animal body*

In the literature you can find research on the oxidation ability of single organs mostly for aromatic compounds. According to studies of SCHMIEDBERG and his students aromatic aldehydes are especially suitable for such determinations. Aliphatic compounds which are much more similar to our body tissue have been rarely used. Without success NENEXX!!! and SIEBER<sup>16)</sup> carried out experiments on the oxidizing ability for glucose and PELLACANI studied the fate of formate.

I have chosen methyl alcohol and formaldehyde for a series of experiments because the degree of oxidation can be determined by quantitative analysis of formic acid. To find out which of the organs are most capable of oxidizing alcohols and aldehydes an apparatus used by M. v. FREY and GRUBER<sup>17)</sup> or JACOBJ<sup>18)</sup> would have been most desirable. Unfortunately I could not study living organs with artificial blood circulation. Since it was not necessary to determine the maximum of the chemical ability but the proportion between the organs I simply used minced organs of animals killed directly prior to analysis. In a glass container a solution of the selected substance dissolved in physiological sodium was added and then shaken vigorously. After 3 to 4 hours in an incubator or water bath the pulp was strained and washed 3 to 4 times. The combined solutions were acidified with phosphoric acid and distilled out of a large flask. The oxidation product – in this case formic acid – was determined quantitatively in the distillate.

In alkaline conditions formaldehyde is converted to formic acid at the above temperatures. In experiments with expected unchanged formaldehyde in the distillate (like in the experiments XV and XVI) the distillates were concentrated under neutral or slightly alkaline conditions (neutralization with calcium carbonate). Furthermore parallel tests were carried out with a certain volume of aldehyde solution. Sodium carbonate was added and the mix remained the same time in the incubator. After acidification the formate content was determined. The obtained values were subtracted of the formate formed by the organ itself. on purpose the tests were carried out without the addition of inhibiting substances. The oxidative ability of the tissue might have been effected. The objection could be raised that the oxidation products were obtained just from living cells. But after all the experiments were very short. In addition, control tests were realized by bringing the organs to boil and cool them without caring about germs. They were analyzed following the same procedures as the spiked xxx organs – with negative results. In addition to that LOEW<sup>19)</sup> could show that formaldehyde is lethal to lower organisms even at very low concentrations. The small weight of canine organs – even after killing several big animals for one experiment – called for a different source. Therefore some experiments were carried

out on organs from the slaughterhouse. Often the organs arrived in the laboratory still warm.

First of all it should be mentioned that formate is not or almost not affected in the isolated viable liver. Formate was added to two liver samples. One of them was immediately strained, rinsed and distilled. The other was incubated for several hours and then analyzed for formate. Both samples yield almost the same percentages of formate.

The next table displays the results of the experiments carried out with methyl alcohol and formaldehyde (0.5% and 1% solutions). Column 5 and 6 contain the weight of the calomel. Formate values were not calculated because of the very small calomel weights.

Table to the experiments on the oxidizing ability of viable organs

#### A. Methyl alcohol

Organ	No.	Animal	Amounts	Calomel [g]	Calomel per 500 g organ [g]	Notes
Muscle	25	Dog	500 g	0.0466	0.0466	
			500 g + 500 mL methanol 1%	0.1200	0.1200	
Liver	26	Dog	100 g	0.0498	0.2490	
			100 g + 150 mL methanol 1%	0.1303	0.4340	calomel not quite clean
Liver	27	Beef	200 g	0.0097	0.0245	
			380 g + 400 mL methanol 1%	0.6304	0.8196	
Liver	28	Beef	200 g	0.0240	0.060	
			250 g + 200 mL methanol 1%	0.0412	0.082	
Liver	29	Horse				control missing
			500 g + 500 mL methanol 1%	0.1595	0.1595	
Kidney	30	Beef	200 g	0.015	0.0375	
			300 g + xxx mL methanol 1%	0.0342	0.0543	

#### B. Formaldehyde

Organ	No.	Animal	Amounts	Calomel [g]	Calomel per 500 g organ [g]	Notes
-------	-----	--------	---------	-------------	-----------------------------	-------



Muscle	31	Dog	500 g	0.0466	0.0466	
			500 g + xxx mL formaldehyde 1% + 1 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.0555	0.0555	
			500 g + 500 mL formaldehyde 1%	0.080	0.080	
Liver	32	Horse	500 g	0.0107	0.0107	
			500 g + 500 mL formaldehyde 0.5% + Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.0555	0.0555	
			500 g + 500 mL formaldehyde 0.5%	0.1899	0.1899	

Interpreting the observed numbers there is no doubt about an oxidizing effect of the liver. The oxidation of formaldehyde in the muscle is less pronounced and methyl alcohol is oxidized even less. Still in every case of methanol addition calomel values increased more than explainable by analytical errors. That means that also methyl alcohol can be oxidized from cells of isolated organs.

PELLACANI was the first to prove the ability of isolated organs to oxidize formate. The results of the above experiments support the evidence for two more aliphatic substances – formaldehyde and methyl alcohol.

The main results of the above study can be summarized in the following sentences:

1. The physiological effect of methyl alcohol is different to the one of ethyl alcohol. The initial state of anesthesia is followed by a comatose state of intoxication for several days.
2. Methyl alcohol converts into formic acid within the organism. The formic acid excretion reaches a maximum only 3 or 4 days after the intoxication. This protracted elimination is not caused by retention of the formed formic acid, but rather by a longer stay of methyl alcohol or another unknown intermediate within the animal body.
3. The physiological effect of formaldehyde is described as a very strong local and general irritation. Therefore it is unlikely that ever during the oxidation of methyl alcohol formaldehyde is formed in large quantities.
4. Not only methyl alcohol but also its ester derivatives, methyl amine, aldehyde sulfonic acid and formaldehyde are converted to formic acid within the body. After administration of ethyl alcohol, acetone and other aliphatic compounds formic acid is not detected. Therefore methyl derivatives are not formed as an intermediate compound during normal oxidization processes in the body.
5. Even the isolated living organs of the animal body sometimes present the ability to oxidize methyl alcohol and – to a greater extent – formaldehyde. Especially the liver of warm-blooded animals proves to be very effective.

Prague, Christmas 1892.

- 1) Work of BODLÄNDER, GEPPERT, WOLFERS, ZUNTZ and others
- 2) Sur la transformation de l'alcool etc. Bruxelles 1887.
- 3) l. c. p. 9. L'alcool dans un organisme sain, normal est détruite presque totalement; l'aldéhyde n'est pas un produit ordinaire de son oxydation. L'aldéhyde introduite dans l'organisme en est éliminée en totalité et sans se modifier.
- 4) Experimental studies on the effect of alcohol on liver and kidney in ZIEGLERs Beiträgen. Vol. IX. p. 349.
- 5) Chemische Berichte. Vol. XXIII. Ref. 599.
- 6) P.v. ROKITANSKY, Wiener med. Jahrb. 1887.
- 7) PFLÜGERs Archiv. Vol. II.
- 8) Compt. rend. Vol. CIV. p. 437.
- 9) Zeitschr. f. phys. Chemie. Vol. VII. p. 375.
- 10) Ricerche ulteriori sopra alcune condizioni di autointossicazione etc. S. A. a xxx der Terapia moderna 1890. p. 12.
- 11) Archiv f. experimentelle Pathol. u. Pharmakol. Vol. XXXI
- 12) Another experimental design was used to answer the question, whether or not the liver retracts an intermediate of the oxidation of methyl alcohol. Again with negative results. Even the viable isolated liver is able to oxidize under favorable circumstances. A liver was removed from an animal two days after administration of methyl alcohol - that is at the acme of formate excretion. If this liver still would contain material to form formate it could well produce more formate per time unit than a reference liver. But, as mentioned later, there was no difference.
- 13) Such aldehyde compounds were successfully used by LOEW and BOKORNY. They solved some plant physiological problems.
- 14) Ph.D. thesis, Rostock (Darmstadt, Winter'sche Buchhandlung, 1889)
- 15) ALBERTONI et LUSSANA, Sul alcool, sull aldeide et sugli eteri vinici. J. xxx Sperimentale 1874. p. 753.
- 16) Journal f. prakt. Chemie. Vol. XXVI. p. 1.
- 17) Du BOL's Arch. 1885. p. 519.
- 18) Archiv f. exp. Path. und Pharm. Vol. XXVI. p. 388.
- 19) MALY's Jahresber. Vol. XVIII. p. 272.

## XI.

Arbeiten aus dem pharmakologischen Institut der deutschen  
Universität zu Prag.

### 32. Ueber die Oxydation des Methyl- und Aethylalkohols im Thierkörper.

Von

Privatdocent Dr. Julius Pohl,  
Assistent des Instituts.

(Mit 2 Abbildungen.)

Die Untersuchungen über das Verhalten des Aethylalkohols im Organismus haben ihren vorläufigen Abschluss dahin gefunden, dass dieser Alkohol zu 90—96 Proc. im Körper verbrannt wird <sup>1)</sup>, der kleine Rest durch die Respiration, Perspiration und den Harn unverändert zur Ausscheidung gelangt. Hingegen besteht über die Zwischenstufen dieser Oxydation, über die Stätte, wo sie sich abspielt, noch keine befriedigende Erkenntniss.

Stets war man geneigt, die Alkoholoxydation im Thierkörper als mit der im Reagensglas künstlich zu erzielenden gleichartig anzunehmen, also eine Aldehyd-, sodann eine Säurestufe bei derselben zu vermuthen. Die chemische Erfahrung lehrt aber, dass sowohl die Natur der Zwischenproducte einer Oxydation, als auch die quantitative Ausbeute an den Endproducten je nach Wahl des oxydirenden Körpers verschieden ist. Der thierische Körper besitzt nun gewiss ein ganz eigenartiges Oxydationsvermögen, das für manche Stoffe äusserst weitgehend, für andere sehr beschränkt ist. Die Art der Oxydationsstufen, die eine Substanz beim Kreisen durch den thierischen Körper durchläuft, ist also a priori durchaus nicht mit Sicherheit zu bestimmen, sondern für jeden einzelnen Fall erst durch das Experiment sicherzustellen.

Der Aethylalkohol soll sich nach Liebig zuerst zu Aldehyd, sodann in Milchsäure, Oxalsäure, Ameisensäure, Kohlensäure oxy-

1) Arbeiten von Bodländer, Geppert, Wolfers, Zuntz u. A.

diren. Duchek und dessen Schüler Kretschy gaben an, nach Alkoholarrreichung im Mageninhalt, ja selbst im Blut- und Leberdestillat Aldehyd gefunden zu haben. Zum Aldehydnachweis bedienten sie sich bloss der Reaction mit ammoniakalischer Silbernitratlösung. Buchheim, Masing, Setschenow, Lallemand, Perrin und Duroy widersprachen den Duchek'schen Angaben. In jüngerer Zeit ist von Albertoni<sup>1)</sup> eine Beobachtung mitgetheilt worden, die es, falls sie einer neuerlichen Untersuchung Stand hielte, wahrscheinlich machen würde, dass die Alkoholoxydation sich nicht in der einfachen Weise abspielt, als man gemeiniglich anzunehmen geneigt ist. Albertoni zeigte, dass selbst kleine Dosen Acetaldehyd, z. B. 1 ccm verdünnter Lösung, unverändert durch Lunge und Niere zur Ausscheidung gelangen, ob sie nun per os oder durch Inhalation aufgenommen worden waren. Dagegen gelingt es niemals nach Alkoholverfütterung in der Expirationsluft oder im Harn Aldehyd nachzuweisen; hieraus folgert Albertoni<sup>2)</sup>, dass es durchaus unwahrscheinlich sei, dass der Alkohol im Körper das Aldehydstadium durchmacht, ohne jedoch darüber eine Vorstellung zu äussern, wie die Oxydation denn anders vor sich gehen könnte. Da diese Beobachtungen nicht durch quantitative Bestimmungen gewonnen sind, so ist durch sie die absolute Unfähigkeit des Thierkörpers für die Oxydation des Aldehyds nicht erwiesen.

Bei dem ausserordentlichen Interesse, das die Oxydation des Alkohols im Organismus verdient, habe ich einige Versuchsreihen mit dem einfachsten der Alkohole, dem Methylalkohol angestellt, in der Erwartung, das hierbei Festgestellte werde auch zur Beurtheilung des Schicksals des Aethylalkohols verwertbare Anhaltspunkte liefern.

### *1. Physiologische Wirkung des Methylalkohols.*

Bevor auf die Ausscheidungsverhältnisse des Methylalkohols eingegangen wird, seien in Kurzem die Allgemeinerscheinungen der Intoxication mit demselben geschildert. Dieselben sind in gewissen Einzelheiten von der Aethylalkoholvergiftung verschieden.

Reicht man einem kräftigen Hund Methylalkohol in genügend grosser Dosis und passender Verdünnung (etwa 40—50 ccm Methylalkohol für 8—10 Kilo Hund), so bemerkt man, wie beim Aethyl-

1) Sur la transformation de l'alcool etc. Bruxelles 1887.

2) l. c. p. 9. L'alcool dans un organisme sain, normal est détruite presque totalement; l'aldéhyde n'est pas un produit ordinaire de son oxydation. L'aldéhyde introduite dans l'organisme en est éliminée en totalité et sans se modifier.

alkohol nach einiger Zeit das Auftreten von Coordinationsstörungen, die sich zunächst unter zunehmendem Bewegungstrieb bis zum Taumeln steigern; dann wird das Thier schlafstüchtig und verfällt in stundenlang andauernden Schlaf. Während aber beim Aethylalkohol das Thier nach mehrstündigem Schlaf in anscheinend normalem Zustand erwacht, ist dies beim Methylalkohol nicht der Fall, sondern der Schlaf dauert mit kurzen Unterbrechungen noch am nächsten Tage an, ja selbst am zweitnächsten Tage ist das Thier bewegungsunlustig, träge, schlafstüchtig und verweigert die Nahrungsaufnahme; gewöhnlich zeigt es erst am dritten oder vierten Tage nach der Alkoholzufuhr seine normale Munterkeit. War die Dosis gross genug, oder hatte das Thier wenige Tage vorher bereits Methylalkohol bekommen, so beobachtete ich oft, dass diese Somnolenz zunahm, bis das Thier am 3. oder 4. Tage — im warmen Zimmer beim Ofen gehalten — an Respirationslähmung zu Grunde ging. Auch an Kaninchen, die im Allgemeinen zu Studien über Alkoholwirkungen weniger geeignet sind als Hunde, bemerkt man nach entsprechenden Dosen (20 g) diese späte, langandauernde und vielfach mit dem Tod der Thiere abschliessende Nachperiode der Methylalkoholwirkung.

Die chronische Methylalkoholintoxication ist ebenfalls von der chronischen Vergiftung mit Aethylalkohol und den übrigen Alkoholen scharf unterschieden. Hunde, weniger Kaninchen, kann man — wie mich eigene behufs experimenteller Erzeugung von Lebercirrhose vergeblich angestellte Versuche lehrten — Monate, ja fast ein Jahr hindurch ohne Schaden für dieselben mit Aethyl-, Isobutyl- oder Amylalkohol füttern. So hatte, um ein Beispiel anzuführen, ein junger, 1190 g schwerer Hund innerhalb 220 Tagen 752 ccm käuflichen Amylalkohol in entsprechender Verdünnung mit Schlundsonde bekommen. Trotz der zahlreichen Rausche war in dieser Zeit sein Körpergewicht auf 4700 g gestiegen. Das Thier, das anfangs nach 1 ccm des Alkohols schwer berauscht war, hatte sich allmählich so an den Amylalkohol gewöhnt, dass später erst 5 ccm diesen Erfolg hatten. Bei der Section fand sich in den parenchymatösen Organen des Unterleibs gar keine Veränderung vor, und auch die mikroskopische Untersuchung von in Flemming's Lösung und in Alkohol gehärteten Organstücken zeigte keine Abweichungen vom Normalen. Hingegen gelang es mir niemals Hunde bei Zufuhr von Methylalkohol, wenn die Dosen auch nicht grösser als 15—20 ccm waren und in zweitägigen Intervallen gegeben würden, länger als wenige Wochen am Leben zu erhalten. Die Thiere lagen gewöhnlich tagelang comatös da, erwachten kaum aus dem Schlafzustand, frassen nicht und

gingen, auch wenn man mit der Alkoholfuhr abbrach, zu Grunde. Als einziger regelmässiger Sectionsbefund ist eine intensive Verfettung der Leber anzuführen, deren Einzelheiten mit den Befunden Kahl-  
den's<sup>1)</sup> sehr gut übereinstimmen. Um über die Intensität dieser Verfettung, die sowohl ihrer starken und raschen Entwicklung, als auch ihrer Constanz wegen bemerkenswerth ist, einen quantitativen Ausdruck zu gewinnen, habe ich in einem Falle das Aetherextract der bei 100° getrockneten Leber bestimmt und mit dem gleichartig gewonnenen Auszug aus der Leber eines dieselbe Kost geniessenden Normalhundes verglichen. Es betrug beim Normalhund der Aetherrückstand 16.6 Proc., bei dem Methylalkoholthier in zwei Proben 37.9 und 37.5 Proc.; es war also ein Anwachsen fast auf das Doppelte der Norm erfolgt.

Bei allen Alkoholversuchen muss das Fällungsvermögen für Eiweisskörper berücksichtigt werden. Aus von mir angestellten Versuchen über die Fällungsgrenze des Methyl- und Aethylalkohols Eiereiweiss gegenüber geht hervor, dass man die Concentration der genannten Alkohole auf circa 20 Proc. steigern muss, um Eiweissausfällung zu erzielen.

## *II. Schicksal des Methylalkohols im Körper.*

Meine ersten Versuche über das Schicksal des Methylalkohols im Körper gingen dahin, zu erfahren, ob nach Verabfolgung desselben eine qualitative Aenderung des Harns statt hat, sei es, dass unveränderter Alkohol übergeht, sei es, dass ein Oxydationsproduct desselben auftritt. Zur Prüfung auf Methylalkohol wird der Harn bei alkalischer Reaction destillirt, das Destillat nochmals nach Schwefelsäurezusatz, sodann mit Kaliumcarbonat destillirt, der Siedepunkt des Destillats bestimmt, und die mit Chromsäuregemisch gewonnenen flüchtigen Oxydationsproducte auf Ameisensäure untersucht. Nachdem die ersten nur qualitativ durchgeführten Versuche übereinstimmend zeigten, dass Methylalkohol als solcher nicht in den Harn übergeht, dagegen die nach Säurezusatz (Phosphorsäure) gewonnenen Harndestillate der Norm gegenüber eine beträchtliche Zunahme der Acidität erfahren, wurde diese Aciditätszunahme bestimmt, die Natur der Säure, auf die diese Zunahme zu beziehen ist, ermittelt und ebenfalls quantitativ bestimmt. Die aprioristische Vermuthung, dass die betreffende flüchtige Säure Ameisensäure sein dürfte, wurde durch alle mit dem Destillat vorgenommenen qualitativen Reactionen,

1) Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Alkohols auf Leber und Niere in Ziegler's Beiträgen. Bd. IX. S. 349.

Reduction von Silbernitrat, salpetersaurem Quecksilberoxydul und Quecksilberchlorid, Färbung mit Eisenchlorid, als richtig erwiesen. Zur quantitativen Formiatbestimmung wurde die Reduction von Quecksilberchlorid zu Calomel benutzt, eine Methode, die technisch schon lange Anwendung gefunden hat und erst jüngst wieder von Scala<sup>1)</sup> empfohlen worden ist, die aber vor ihrer Anwendung auf den Harn in Betreff ihrer Verlässlichkeit geprüft werden musste.

Man kocht zur Formiatbestimmung die neutrale oder schwach essigsäure Lösung mit dem gleichen Volumen kalt gesättigter Sublimatlösung auf dem Wasserbade, lässt dann einige Stunden in der Kälte stehen, bringt den Calomelniederschlag auf ein gewogenes Filter, wäscht chlorfrei, trocknet bei 100° zur Gewichtsconstanz und wägt. 1 g Calomel entspricht 0.09756 g freier Ameisensäure, oder die gefundene Calomelzahl mit dem Factor 0.1442 multiplicirt ist gleich der entsprechenden Menge ameisensauren Natriums. Im Folgenden sind alle Calomelzahlen auf ameisensaures Natrium umgerechnet.

Als Belege für die Verwendbarkeit der Methode überhaupt und für den Harn im Speciellen seien im Folgenden einige Versuche angeführt, bei denen die Fettsäuren durch Destillation nach Ansäuern mit 50 ccm 20 proc. Phosphorsäure<sup>2)</sup> gewonnen wurden. Die Destillation wurde bis zum Aufhören saurer Reaction des Uebergehenden getrieben, wozu 8—12stündige, bei den Thierversuchen oft tagelang fortgesetzte Destillation nöthig war. Die gesammten Destillate wurden mit eisenfreier Lauge oder Natriumcarbonat neutralisirt, im Sandbad eingeeengt; fielen Niederschläge aus, so wurde das eingeengte Destillat in einen Maasscylinder gebracht, filtrirt und mit einem aliquoten Theil die Formiatbestimmung vorgenommen.

Versuch I.

Genommen durch Analyse als rein  
erwiesenes Natrium-Formiat . . = 0,3750 g  
gefunden . . . . . = 0,3754 g = 100,1 Proc.

Versuch II.

Von demselben Präparat wie in Versuch I werden 0,5779 g zu 100 ccm Harn gefügt.

Andere 100 ccm desselben Harns liefern . . . . . 0,0980 Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> A)  
der Harn, dem Formiat zugesetzt worden war, liefert 4,1209 Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> B)  
A—B = 4,0229 Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

entsprechend = 0,5801 Natriumformiat;  
somit 100,3 Proc. der zugesetzten Menge.

1) Chemische Berichte. Bd. XXIII. Ref. 599.

2) P. v. Rokitansky, Wiener med. Jahrb. 1887.

## Versuch III.

70 ccm Harn + 0,2421 Formiat = A)

70 ccm Harn allein = B. A liefert 1,7229 Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
 B = 0,0763 Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
 A—B = 1,6466 Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
 = 0,24068 Formiat = 99,4 Proc.

Die vorstehenden Zahlen erweisen die Verwendung dieser Methode für den Harn als zulässig.

## Intoxicationsversuche.

Da der normale Hundeharn stets kleine Mengen Ameisensäure enthält, so wurde vor Anstellung des Versuches der normale Harn auf Acidität und Formiatmenge untersucht. Die entsprechenden Werthe sind natürlich von den nach Alkoholaufnahme ausgeschiedenen Formiatmengen in Abzug zu bringen. Die Normalwerthe des Formiats erreichen selten die Grösse eines Centigramms auf die eintägige Harnmenge.

## Versuch IV. 8120 g schwerer Hund.

Datum	Harnmenge in ccm	Gesamtaacidität des Destillates in ccm 1/10 N. NaOH	Formiat- mengen in g	Bemerkungen
15. Dec.	230	4,6	Bestimmung misslungen	7 h Abends 60 ccm Methylalkohol.
15. Dec. 1/28 h Abd.	133	39,6	0,055	—
16. Dec.	195	78,4	0,354	Thier den ganzen Tag träge, frisst nicht.
17. "	425	434,1	0,933	—
18. "	225	110,0	0,684	—
19. + 20. "	364	190	0,441	—
21. "	195	6,6	0,007	—

Körpergewicht des Thieres am 21. = 7280 g.

## Versuch V. Dasselbe Thier wie in Vers. IV.

9. Januar	215	6,3	0,0041	12 h 48 ccm Methylalkohol.
10. "	290	—	0,0479	—
11. "	118	28,6	0,0916	—
12. "	152	90,4	0,3247	Abends Erbrechen, Thier frisst nicht.
13. "	158	—	0,3989	—

Thier somnolent, 14 Respirationen in der Minute; es geht 11 h. Vormittags an Respirationslähmung zu Grunde. Schlussgewicht 6450 g. Die Section ergibt mit Ausnahme einer besonders bei mikroskopischer Untersuchung deutlichen Verfettung der Leberzellen nichts Abnormes.

Versuch VI. 8200 g schwerer Hund liefert am 6. 300 ccm Harn mit 0,0286 Formiat. 10 h. 10 ccm verdünnten Methylalkohols; es tritt kein Anzeichen von Narkose ein.

Am 7. 182 ccm Harn mit 0,0065 Formiat  
 = 8. 300 = = = 0,2932 =  
 = 9. 305 = = = 0,008 =



Versuch VII. 2370 g schweres Kaninchen.

9. 61 ccm Harn mit 0,0082 g Formiat.

9. 7 h. Abends 16 ccm Methylalkohol auf 40 ccm Wasser. Keine Narkose.

10. 85 ccm Harn mit 0,0108 Formiat.

11. } 75 ccm Harn mit 0,0128 Formiat.

12. }

13. 25 ccm Methylalkohol.

14. Parese der hinteren Extremitäten. 161 ccm Harn mit 0,0722 g Formiat.

Die vorstehend angeführten Versuche zeigen, speciell beim Hunde, eine tagelang andauernde, allmählich sich steigernde, dann abnehmende Formiatausscheidung. So finden wir im Versuch IV erst am 4. Tage nach der Alkoholaufnahme das Maximum der Formiatausscheidung. Versuch VI lehrt, dass kleine weder Narkose noch Darmreizung veranlassende Mengen Methylalkohols eine, wenn auch geringe Formiatausscheidung hervorrufen, die zwischen der 24. und 48. Stunde nach der Alkoholaufnahme ihre maximale Höhe erreicht.

Die Versuche fordern Besprechung und Verarbeitung nach den verschiedensten Richtungen.

Vor Allem sei auf die Eingangs berührte Frage der Alkohol-oxydation zurückgekommen. Die Versuche lehren, dass Einführung des Methylalkohols zur Ausscheidung der ihm entsprechenden Säure führt. Gilt dies auch vom Aethylalkohol? Oder aber, bringt jede protrahirte Narkose unabhängig von Alkoholzufuhr Formiatausscheidung zu Wege? Der Beantwortung dieser Fragen, die zum Theil dadurch erledigt werden, dass sich der Methylalkohol in Dosen, die gar keine Narkose hervorrufen, gleichsinnig verhielt, dienen folgende Versuche.

Versuch VIII. Aethylalkohol. 6650 g schwerer Hund.

5. Februar. 310 ccm Harn. Gesamttacidität des Destillats = 20,1 ccm N. Natron; mit 0,007 g Formiat.

6. Februar. 20 ccm Aethylalkohol in Wasser.

7. Febr. 492 ccm Harn. Gesamttacidität des Destillats = 21,8 ccm  $\frac{1}{10}$  N. Natron.

Bei der Kleinheit der Aciditätsdifferenz wurde die Formiatbestimmung nicht vorgenommen.

Ein zweiter Versuch an einem anderen Thier mit Aethylalkohol ergab ein dem vorstehenden gleiches — negatives — Resultat.

Versuch IX.

Dasselbe Thier wie in Versuch VIII erhält, nachdem es am 13. Februar 276 ccm Harn mit einer Acidität = 9,0 ccm  $\frac{1}{10}$  N. Natron geliefert, Vormittags 10 ccm Paraldehyd + 60 ccm Wasser. Nach  $\frac{1}{2}$  Stunde schläft das Thier. Nachmittags 4 h. schläft das Thier noch und scheidet

dann 65 ccm deutlich nach Paraldehyd riechenden Harns aus. Acidität des Destillats = 8,2 ccm  $\frac{1}{10}$  N. Natron.

Der Aethylalkoholversuch spricht in voller Uebereinstimmung mit anderweitigen Erfahrungen über die Oxydation des Aethylalkohols dafür, dass derselbe verbrannt wird, ohne dass auch nur ein Bruchtheil einer intermediär sich bildenden Säure in den Harn übergeht. Obwohl erst jüngst wieder Zuntz und Mallèvre <sup>1)</sup> die leichte Oxydirbarkeit selbst intravenös gereichten Acetats gezeigt haben, so habe ich mich doch noch selbst hiervon überzeugt. Von 2,7 g Natriumacetat erschienen, aus der Steigerung der Destillatacidität gegenüber dem Vortage gemessen, nur 0.003 g im Harn wieder. Es besteht somit zwischen dem Aethyl- und Methylalkohol eine Verschiedenheit im Ablauf der Oxydation, indem bei letzterem die Ueberführung in Kohlensäure eine minder vollständige ist, und verspätete Ausscheidung eines Zwischenproductes stattfindet. Es läge nahe, diese chemische Differenz mit der oben berührten Verschiedenheit in der Dauer der Narkose in Beziehung zu bringen.

Wie kommt nun die protrahirte Formiatausscheidung zu Stande? Sie könnte vor Allem auf einer Eigenthümlichkeit des Formiats in Bezug auf seine Oxydationsfähigkeit und Ausscheidbarkeit beruhen. In dieser Hinsicht finden sich in der Literatur folgende Angaben.

Gréhant und Quinquaud <sup>2)</sup> geben an, dass Ameisensäure nach den verschiedensten Applicationsweisen unverändert in den Harn übergeht, was z. T. auch mit Schotten's <sup>3)</sup> Anschauung übereinstimmt, der bis 26 Proc. des verfütterten Formiats im Harn wiederfand. Pellacani <sup>4)</sup> hingegen meint, dass Formiat im Körper grösstentheils zerstört wird, indem er von 4 g Formiat, das per os gereicht worden war, in dem Harn des nächsten und zweitnächsten Tages 0.56 g wiederfand. Um hierüber nun zu einem entscheidenden Urtheil zu gelangen, habe ich folgende Versuche angestellt.

Versuch X. 7900 g schwerer Hund liefert am 8. 135 ccm Harn mit 0,010 Formiat. Er erhält 1,0304 g bei 100° getrockneten Formiats in 30 ccm Wasser.

Am 9. und 10.	liefert er	225 ccm Harn mit	0,071 Formiat	
= 10.	=	=	95	= = = 0,019 =
= 12.	=	=	—	= = = 0,008 =

1) Pflüger's Archiv. Bd. II.

2) Compt. rend. Vol. CIV. p. 437.

3) Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. VII. S. 375.

4) Ricerche ulteriori sopra alcune condizioni di autointossicazione etc. S. A. a. der Terapia moderna 1890. p. 12.

Unter Annahme einer täglichen Formiatausscheidung von 1 Centigramm wurden nach der Salzfütterung 6 Centigramm = 5.8 Proc. der verfütterten Menge ausgeschieden.

Versuch XI. 7750 g schwerer Hund.

2. Februar 120 ccm Harn mit 0,0071 g Formiat.

11 h. Vormittags Injection von 1,2532 g Formiat in Wasser gelöst per Schlundsonde.

Nachmittags 71 ccm Harn mit 0,1649 Formiat

3. u. 4. Febr. 172 ccm Harn mit 0,0834 Formiat.

5. Febr. 175 ccm Harn. Formiatmenge sehr gering, wegen Unreinheit nicht gewogen.

Bei Annahme einer täglichen Ausscheidung von 7 Milligramm Formiat wurden in 3 Tagen 0.2341 Formiat ausgeschieden, also 18 Proc. des eingeführten.

Ich bin daher unter Verwerthung der Versuchsergebnisse oben genannter Forscher der Ansicht, dass der Hundeorganismus kleine Formiatmengen (etwas weniger als 1 g auf 7 Kilo Hund) völlig verbrennt, im Falle, dass die gereichte Menge über diese Grenze hinausgeht, einen Theil unverändert ausscheidet. Keineswegs darf die, meines Wissens ohne Analogie dastehende, allmählich ansteigende Formiatausscheidung durch eine Eigenart des Formiats erklärt werden, da dieses nach innerer Darreichung wie andere Salze bereits nach 24 Stunden den Körper zum grössten Theil verlassen hat.

Hingegen wäre es nicht unmöglich, dass im Körper selbst entstehendes Formiat an der Stätte seiner Bildung (vielleicht in besonderer Form gebunden) zurückgehalten und erst allmählich in den allgemeinen Kreislauf entlassen wird. Diese Vermuthung bestimmte mich, folgenden Versuch zu machen, der dahin zielte, durch eine erzwungene Durchströmung des Körpers etwa bereits vorgebildetes Formiat zur Ausscheidung zu bringen.

Versuch XII. 6400 g schwerer Hund.

21. März 170 ccm Harn mit 0,0096 Formiat.

Abends 7 $\frac{1}{2}$  h. 35 ccm Methylalkohol + 80 ccm Wasser per Schlundsonde.

22. März früh 207 ccm Harn mit 0,0108 Formiat.

22. März 4 h. Nachm. 240 ccm Harn mit 0,0756 Formiat.

Das Thier wird nun aufgespannt und durch die Vena jugul. zuerst 500 ccm 1 proc. NaCl, sodann 400 ccm erwärmter 2 proc. NaCl-lösung injicirt.

Bis 8 h. Abends entleert das Thier 1130 ccm Harn mit 0,3395 Formiat.

Am 23. März	230	ccm	Harn	mit	0,8752	Formiat
= 24. =	130	=	=	=	0,3460	=
= 25. =	166	=	=	=	0,626	=
= 26. =	180	=	=	=	0,0122	=

Die Durchspülung hat zwar ein Plus an Formiat zur Ausscheidung gebracht, doch entspricht die Concentration fast genau der Formiatausscheidung vor der Ausspülung. Erst am nächsten und zweitnächsten Tage nach derselben treten bei geringen Harnmengen die grossen Formiatwerthe auf. Für die Anschauung, dass vorgebildetes Formiat im Körper zurückgehalten wird, bringt also dieser Versuch keine Stütze. Nun könnte aber trotzdem Ameisensäure im Organismus in einer Weise gebunden sein, die durch die blosse Durchspülung nicht gelockert wird. Es wurden daher einem Thiere, das sicher auf der Höhe der Formiatausscheidung begriffen war, die Organe entnommen und in denselben direct das Formiat bestimmt.

#### Versuch XIII. Ueber 7 Kilo schweres Thier.

1. Juni 570 ccm Harn mit einer Formiatmenge von 0,0106 g.

Um 12 h. erhält das Thier 25 ccm Methylalkohol auf 150 ccm Wasser.

Am 2. 400 ccm Harn, am 3. 520 ccm; am 3. Nachm. 122 ccm Harn mit 0,2442 Formiat. Das Thier wird durch Verbluten getödtet, die Organe mit einer Wurstmachine zerkleinert, mit physiologischer Kochsalzlösung angerührt, je 50 ccm Phosphorsäure hinzugefügt und destillirt. Es ergaben:

100 ccm Blut	=	0,0004 g	Formiat
100 g Leber	=	=	=
100 g Muskel	=	0,0005 g	=
27 g Niere	=	0,0345 g	=
50 g Lunge	=	0,00044 g	=

Nach dem Ergebniss dieses Versuchs kann von einer Aufspeicherung von ameisensaurem Salz im Thierkörper nicht die Rede sein.

Die späte Ausscheidung desselben muss sonach darauf beruhen, dass der Methylalkohol als solcher oder ein Abkömmling desselben im Körper zurückgehalten und erst allmählich oxydirt wird. Von diesem Gesichtspunkte aus habe ich zwei Versuchsreihen durchgeführt, von denen die erste den Zweck verfolgte, an den Organen mit Methylalkohol vergifteter Thiere wenigstens qualitativ den Nachweis zurückgehaltenen Methylalkohols oder desjenigen Derivats, das hier zunächst in Betracht kommt, des Formaldehyds, zu liefern, die zweite die Formaldehydvergiftung als mögliches Zwischenstadium der Intoxication mit Methylalkohol in chemischer und physiologischer Richtung kennen lehren sollte.

Der Methylalkohol ist, besonders in so kleinen Mengen, wie sie in diesen Versuchen in Frage kommen, weit schwieriger nachweisbar, als Aethylalkohol. Gewinnt man aus den Organen durch Destil-

lation bei neutraler oder schwach alkalischer Reaction eine Flüssigkeit, die bei wiederholter Destillation mit Schwefelsäure, mit Kaliumcarbonat (um Wasser zurückzuhalten), schliesslich bei fractionirter Destillation ein bei 66 oder 66.5° übergehendes neutrales Destillat von charakteristischem Geruch liefert, so ist dies der wichtigste Anhaltspunkt für seine Erkennung. Die nachfolgende Oxydation zu Ameisensäure, die immer vorgenommen werden muss, entscheidet natürlich deswegen nicht, weil zahlreiche organische Moleküle, darunter auch flüchtige Harnbestandtheile, unter Formiatbildung oxydirt werden.

Trotz meiner Bemühungen gelang es mir nicht, in den Organen von Thieren, die sich am 2. oder 3. Tage nach der Methylalkoholaufnahme, also in voller Formiatausscheidung befanden, unveränderten Methylalkohol in den Destillaten nachzuweisen. Auch bezüglich des Aldehydnachweises (mit Fuchsin und schwefliger Säure) war ich nicht glücklicher; nur ein einziger Versuch sprach für eine, wenn auch geringe Aldehydbildung.

#### Versuch XIV.

Ein 5 Kilo schwerer Hund erhält am 17. Vormittags 30 ccm Methylalkohol auf 120 Wasser. Das Thier erbricht  $\frac{1}{2}$  Stunde nach der Darreichung. Nachmittags gegen 5 h. noch 15 ccm Methylalkohol auf 50 Wasser. Nach wenigen Minuten Schwanken, Taumeln. Am 18. liegt das Thier zusammengekauert, wie krank, im Käfig, erhebt auf Anrufen und Berühren nur den Kopf, ohne aufzustehen. 19. früh Tod durch Verbluten.

Blut direct destillirt giebt keine Fuchsinreaction.

Blut mit verdünnter Schwefelsäure destillirt giebt deutliche Fuchsinreaction.

Leber direct destillirt giebt keine Fuchsinreaction.

Leber mit verdünnter Schwefelsäure destillirt giebt schwache Fuchsinreaction.

Muskel direct destillirt sehr starke Fuchsinreaction.

Bei einem Parallelversuch am normalen Thiere ergab sich bezüglich des Blutes und der Leber ein gleiches Verhalten, hingegen gaben die Muskeln bei directer Destillation eine viel schwächere Fuchsinreaction. Es deutet sonach nur die grössere Intensität der Reaction in den Muskeln auf die Gegenwart von Formaldehyd. Bedenkt man jedoch, wie stark diese Reaction selbst noch bei tausendfacher Verdünnung des Formaldehyds auftritt, erwägt ferner, dass nur in dem allerersten Theil des Destillats die Reaction deutlich war und später ganz aufhörte, so kann die vorhandene Aldehydmenge nur eine minimale gewesen sein und ist daher eine Beziehung der späten Formiatausscheidung zu einem Zurückhalten von Aldehyd nicht anzunehmen.<sup>1)</sup>

1) Noch eine andere Versuchsanordnung zog ich ebenfalls mit negativem Erfolg zur Lösung der Frage, ob etwa die Leber ein intermediäres Oxydationspro-

Uebrigens war noch zu erweisen, ob Zufuhr von Formaldehyd überhaupt zu einer Formiatausscheidung führt. Hierzu wurde der folgende Versuch angestellt.

Da es möglich erschien, dass unveränderter Aldehyd zwar in den Harn und die gewonnenen Destillate übergeht, durch das Eindampfen bei alkalischer Reaction aber oxydirt oder in reducirende Condensationsproducte übergeführt wird, habe ich die Harndestillate mit Kalkwasser neutralisirt und bei ganz schwach alkalischer Reaction eingedampft. Theilte ich das Destillat eines normalen Hundeharns in zwei gleiche Theile, setzte zu dem einen direct einige Tropfen Formaldehyd und verfuhr wie oben angegeben, so differirten die beiden Bestimmungen nur um innerhalb der Wägungsfehler gelegene Werthe (2 Decimilligramm).

#### Versuch XV.

4400 g schwerer Hund schied am 7. 130 ccm Harn aus mit 0,0022 g Formiat.

Er erhält Vormittags 4 ccm eines 40 proc. Formaldehyd in 40 ccm 0,6 proc. Kochsalzlösung subcutan.

Er liefert Nachmittags 75 ccm Harn mit 0,0357 Formiat.

Am 8., 9. und 10. 75 = = = 0,0312 =

Am 11. 95 = = = 0,002 =

Der Versuch beweist die Möglichkeit der Oxydation des Aldehyd durch den thierischen Organismus. Der Umstand, dass nur kleine Mengen Aldehyds, ob der local reizenden Eigenschaften desselben, subcutan gegeben werden können, sowie der ausstehende Nachweis etwa unverändert in den Harn übergehenden Aldehyds bestimmten mich, diesen Versuch in der Form abzuändern, dass statt reinen Aldehyds das nicht reizende, in alkalischer Lösung unter Aldehydabspaltung zerfallende formaldehydschweflige saure Natron (richtiger oxymethansulfonsaures Natron)  $\left( \text{CH}_2 < \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{SO}_3 \text{ Na} \end{array} \right)$  zu verwenden.<sup>1)</sup> Es gelingt nicht leicht, diese Verbindung analysenrein zu gewinnen, selbst dann nicht, wenn man sich an die jüngste Vor-

duct des Methylalkohols zurückhält, heran. Wie später ausgeführt werden soll, vermag auch die überlebende isolirte Leber unter günstigen Bedingungen Oxydationen auszuführen. Wenn man einem in der Acme der Formiatausscheidung befindlichen Thier am 2. Tage nach der Methylalkoholdarreichung die Leber entnimmt, so könnte von derselben, falls sie das Material zur Formiatbildung enthalte, in bestimmter Zeit mehr Formiat gebildet werden, als von einer Controlleber. Der Versuch aber ergab, wie gesagt, keine Differenz.

1) Derartige Aldehydverbindungen sind bereits mit bestem Erfolg von Loew und Bokorny zur Lösung pflanzenphysiologischer Probleme herangezogen worden.

schrift von Kraut-Eschweiler<sup>2)</sup> hält. Hingegen bewährte sich ein Vorschlag des Herrn Prof. Hofmeister, statt des Bisulfits das Pyrosulfit zu benutzen, in erfreulichster Weise. Das erhaltene Formalddehyd-Natriumsulfit entsprach seinem Natriumgehalt nach sehr gut obiger Formel. Mit demselben wurde folgender Versuch angestellt.

#### Versuch XVI.

6600 g schwerer Hund liefert am 5. 137 ccm Harn mit 0,0173 g Formiat. Derselbe erhält am 5. Nachmittags 5 g des Aldehydnatriumsulfits in 10 proc. Lösung subcutan.

Am 6. und 7. liefert er 250 ccm Harn mit 0,1889 g Formiat.

Am 8. 315 ccm mit 0,0577 g Formiat.

Am 9. 467 ccm mit 0,0256 g Formiat.

Es gab weder der Harn vom 6. und 7., noch in einem zweiten Versuch, wo das Thier 2 g des Aldehydnatriumsulfits subcutan erhalten hatte, das Destillat des mit Alkali versetzten Harns über die Norm starke Aldehydreactionen (mit Fuchsin und schwefeliger Säure, mit ammoniakalischem Silber). Wäre in Versuch XVI alles Aldehyd als Formiat ausgeschieden worden, so hätten 2.5 g Formiat im Harn gefunden werden müssen; es fand sich der Norm gegenüber jedoch nur ein Plus von 0.20 g Formiat. Da das Thier gar keine Erscheinungen der Aldehydintoxication darbot, auch die Expirationsluft niemals nach Aldehyd roch, wie sie es thut, wenn man direct Aldehyd subcutan giebt, so wird man zu dem Schluss geführt, dass in diesem Versuch in weit ausgedehnterem Maasse als im vorangegangenen Oxydation des Aldehyds stattgefunden hat.

Durch diese Versuche ist also die Thatsache der Aldehydoxydation im thierischen Körper nachgewiesen. Es wäre nun nicht unmöglich, dass, wenn dem Körper sehr viel Bisulfit zur Verfügung stände, dann der ihm zugeführte oder in ihm aus Methylalkohol entstehende Aldehyd vorübergehend in die salzartige Verbindung übergeführt würde und hierdurch vielleicht der zeitliche, qualitative und quantitative Verlauf der Oxydationsvorgänge eine Aenderung erfahren könnte. Von diesem Gesichtspunkte aus wurden folgende Versuche angestellt.

#### Versuch XVII.

9800 g schwerer, junger Hund liefert am 29. Februar 308 ccm Harn mit 0,044 g Formiat. Die Verabfolgung von 3 g Natriumbisulfit, in Wasser gelöst, hatte ein Auftreten von Aldehydkörpern im Harn nicht zur Folge.

1) Dissertation, Rostock (Darmstadt, Winter'sche Buchhandlung, 1899).

1. März 370 ccm mit Stuhl gemischten Harn. Die Formiatbestimmung misslungen, da der geringe Calomelniederschlag durch Hg oder HgS schwarz verfärbt erscheint.

12 h. 3 g neutralisirten Bisulfit in Wasser gelöst subcutan, gleich darauf 30 ccm Methyalkohol auf 110 Wasser per os.

2.}	672 ccm Harn mit 3,440 Formiat	} 5,620 Formiat.
3.}		
4.	312 = = = 1,284 =	
5.	610 = = = 0,896 =	
6.	162 = = = 0,033 =	

Versuch XVIII. 6500 g schweres Thier.

7. Nachmittags 135 ccm Harn mit 0,0013 Formiat.

4 h. Nachmittags 3 g Bisulfit subcutan.

8.	265 ccm Harn mit 0,6344 Formiat	} = 5,5451 g.
9.	300 = = = 0,5210 =	
10.	280 = = = 2,6910 =	
11.	150 = = = 1,6987 =	
12.	190 = = = 0,0713 =	

Die beiden vorstehenden Versuche haben gemeinsam das Resultat, dass in ihnen die grössten Formiatwerthe gefunden wurden, die überhaupt im Verlauf der ganzen Untersuchung zur Beobachtung gelangten. In einem dritten gleichartig angestellten Versuch, wo allerdings nur 2 g Bisulfit gegeben wurden, bewegten sich die Formiatzahlen in den gewöhnlichen Grenzen; da das Thier jedoch an Durchfall litt, so steht dieser Versuch wohl in keinem unbedingten Widerspruch mit den beiden vorangegangenen. Eine gesteigerte Diuresis rief das Bisulfit nicht hervor. Ich begnüge mich, hier die Möglichkeit einer Beeinflussung der Formiatausscheidung durch das Bisulfit festgestellt zu haben, ohne eine Deutung derselben, die sich vorläufig doch nur in Hypothesen bewegen müsste, geben zu wollen.

Ich bestimmte ferner noch den Oxydationsverlauf bei intravenöser Darreichung des Methyalkohols.

Versuch XIX. 5900 g schwere Hündin.

10. April 340 ccm Harn mit 0,0134 Formiat.

11. Nachmittags 5 h. Injection von 20 ccm Methyalkohol mit Wasser auf 100 ccm verdünnt in die Vena jugularis. Injectionsdauer  $\frac{1}{2}$  Stunde. Nach dem Abspannen zeigt das Thier leichte Coordinationsstörung, taumelnden Gang bei vollem Bewusstsein.  $\frac{1}{2}$  Stunde später ist das Thier sehr aufgeräumt, frisst.

12.	160 ccm Harn mit 0,1490
13.	150 = = = 1,0210
14.	308 = = = 2,1152
15.	228 = = = 0,8700
16.	300 = = = 0,4225



Das Resultat dieses Versuches ist, dass auch bei directer Einfuhr des Methylalkohols ins Blut, gewissermaassen bei Ueberschwemmung des Organismus mit demselben, an dem Oxydationsvorgang speciell an dem Typus der Formiatausscheidung, keine Aenderung gegenüber der Aufnahme vom Magen aus eintritt.

Es möge hier noch kurz ein Versuch am Menschen Platz finden, der lehrt, dass im menschlichen Organismus die Methylalkoholoxydation in gleicher Weise wie im thierischen vor sich geht.

Versuch XX. Versuchsperson 31 Jahre alt, 62 Kilo schwer.

10 h. 25 ccm Methylalkohol auf 125 Wasser.

Harnmenge am 1. Tage	1620 ccm	mit	0,0551 g	Formiat	
=	=	2. =	1295	=	0,6197 g =
=	=	3. =	1480	=	0,1323 g =
=	=	4. =	1220	=	0,0431 g =

Die mitgetheilten Versuche haben für die Eingangs gestellte Frage der Form der Alkoholoxydation die Antwort gebracht, dass ein beträchtlicher Theil des Methylalkohols zu Formiat oxydirt und dann durch den Harn ausgeschieden wird, dass ferner dem über Tage hin ausgedehnten, der Intensität nach erst ansteigenden, dann allmählich abklingenden Vergiftungsbild eine gleichsinnige protrahirte Formiatausscheidung entspricht. Ob aber die Gesammtmenge des Alkohols vor der Oxydation zu Kohlensäure durch das Säurestadium hindurchgeht, wie wahrscheinlich, oder ob ein Theil vielleicht in anderer Weise verbrannt wird oder durch Bildung von Zwischenproducten der Oxydation entgeht, müsste erst durch andere Versuchsanordnung zu bestimmen versucht werden. Glykuronsäurebildung nach Methylalkoholaufnahme wurde nicht beobachtet.

### III. Physiologische Wirkung des Formaldehyds.

Die durch Albertoni neu angeregte Frage, ob der Alkohol durch das Aldehydstadium hindurch zur Säure oxydirt wird, ist für den Methylalkohol ebenso zu stellen wie für den Aethylalkohol. Neben anderen zum Theil schon berührten Anhaltspunkten für die Erörterung derselben schien der Vergleich der physiologischen Wirkung des Formaldehyds mit Methylalkoholintoxication nicht unwichtig. Das Ergebniss meiner Formaldehydversuche in dieser Richtung geht dahin, dass in keiner Periode, bei keiner Applicationsart des Formaldehyds Symptome auftreten, die auch nur im Entferntesten an die der Methylalkoholintoxication erinnern. Ueber die Allgemeinwirkungen des Formaldehyds liegen bisher keine experimentellen Untersuchungen vor; meine Versuche lehrten mich, dass dieselben qualitativ durch-

aus den von Albertoni<sup>1)</sup> bezüglich des Aethylaldehyd festgestellten gleichen, nur scheint der Formaldehyd quantitativ giftiger als der Acetaldehyd. Bei beiden tritt, selbst nach kleinen Gaben, bei innerer Application, Salivation, Erbrechen, Narkose, Coma und Tod ein, mit dem Sectionsbefund einer schweren Gastroenteritis, die in der localen Reizwirkung der Aldehyde ihre Erklärung findet. Weit bemerkenswerther ist ein sowohl bei subcutaner, wie intravenöser Application zu beobachtender Einfluss auf die Respiration. Als Beleg sei hier ein Bruchstück aus der Respirationcurve eines Hundes wiedergegeben, der innerhalb einer halben Stunde 3 ccm Formaldehydlösung von circa 90 Proc. in Wasser gelöst erhalten. Fig. 1 zeigt den Respirationstypus vor, Fig. 2 nach beendeter Injection bei gleich schnellem Gang der Trommel während einer halben Minute.

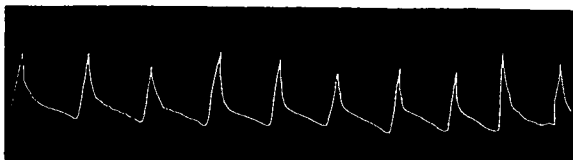


Fig. 1. Normaler Respirationstypus.

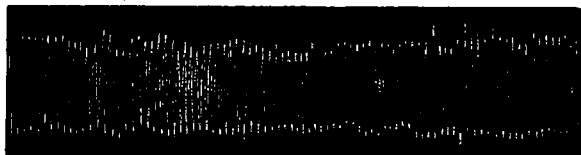


Fig. 2. Respiration nach Formaldehydinjection unter die Haut.

Zumeist tritt wenige Secunden nach jeder Injection unter Zunahme des Athemvolumens eine beträchtliche Respirationsvermehrung ein, die in einigen Fällen bald auf die normale Zahl heruntergeht oder aber, wie im angezogenen Fall, schliesslich zu einer dauernd beschleunigten und vertieften Athmungsform führt. Auf den Blutdruck wirkt der Formaldehyd bei Hunden wenig ein; während der Periode stürmischer Respiration geht der Blutdruck kaum in die Höhe. Bei Kaninchen hingegen geht auf die Injection von Formaldehyd der Blutdruck anfänglich unter Pulsverlangsamung in die Höhe, ändert sich dann aber nicht mehr. Die Respiration wird verlangsamt, und die Thiere gehen durch Respirationslähmung zu Grunde.

#### IV. Oxydation anderer Methylalkömmlinge.

Die geringere Oxydirbarkeit des Methylalkohols gegenüber dem ihm homologen Aethylalkohol kann nach Obigem darin ihre vor-

1) Albertoni et Lussana, Sul alcool, sull'aldeide et sugli eteri vinici. Lo Sperimentale 1874. p. 753.

läufige Erklärung finden, dass der Körper die bei letzterem intermediär gebildete Essigsäure selbst in grossen Mengen noch zu zersetzen vermag, während er für die Formiate nur ein bald erschöpftes Oxydationsvermögen besitzt. Es war naheliegend, diese Reaction des Organismus dazu zu benutzen, über die Oxydationsart anderer zusammengesetzter Körper der Fettsäurereihe Aufschluss zu gewinnen. Geht ihr Abbau in der Weise vor sich, dass er zur Abspaltung von Methyl- oder Formylgruppen führt, dann wäre auf ihre Aufnahme eine beträchtliche Formiatausscheidung im Harn zu erwarten. Zu diesem Zwecke ist es nothwendig, eine grosse Zahl solcher Körper zu untersuchen, um nicht etwa auf Grund zufälliger, d. h. von anderen Bedingungen abhängiger Uebereinstimmung ein vorschnelles Urtheil zu fällen. Ich habe nur Aceton, Methylacetat, Methylamin in dieser Richtung untersucht.

Versuch XXI. 5 Kilo schwerer Hund.

7. Febr. 170 ccm Harn, Acidität der Destillate =  $3,4 \frac{1}{10}$  N. Natron, mit 0,0027 Formiat. Erhält 37 ccm reines Aceton, entsprechend verdünnt, per Schlundsonde. Unterbindung des Oesophagus. Thier zeigt zuerst vermehrten Bewegungstrieb, taumelt, schläft dann binnen Kurzem ein.

8. 110 ccm Harn, Acidität =  $7,1 \frac{1}{10}$  N. Natron mit 0,0217 Formiat.  
9. 190 ccm Harn, Acidität =  $6,9 \frac{1}{10}$  N. Natron.

Versuch XXII. 9800 g schwerer Hund.

19. 195 ccm Harn mit 0,0110 Formiat.  
10 h. 45 m. 20 ccm reines Aceton.  
20. 317 ccm Harn mit 0,0219 Formiat.  
21. 377 ccm Harn mit 0,0123 Formiat.

Versuch XXIII.

1. Tag. 212 ccm Harn mit 0,00932 Formiat. Das Thier erhält 10 ccm Methylacetat auf 50 ccm Wasser. Es schläft bald darauf ein, ist aber Nachmittags wieder munter.

2. Tag 270 ccm Harn mit 0,2520 Formiat.  
3. = 170 = = = 0,2344 =  
4. = 150 = = = 0,0064 =

Versuch XXIV. 5 Kilo schwerer Hund.

1. Tag. 210 ccm Harn mit 0,00648 Formiat.  
12 h. 2 g Methylamin. hydrochlor., in Wasser gelöst, per os.  
2. Tag 196 ccm Harn mit 0,0996 Formiat.  
3. = 250 = = = 0,0152 =  
4. = 345 = = = 0,0025 =

Während Methylacetat und Methylamin relativ grosse Formiatwerthe ergeben, ist die Ameisensäureausscheidung nach Aceton nur minimal zu nennen.

Nach dem Gesagten tritt Bildung von Ameisensäure nur nach Darreichung von Methylderivaten: Methylalkohol, Methyl ester, Formaldehyd, Oxymethansulfonsäure, Methylamin ein, nicht aber nach Darreichung von Körpern, welche die  $\text{CH}_3$ -gruppen an Kohlenstoff gebunden enthalten, wie im Aethylalkohol oder im Aceton. Dies entspricht der That- sache, dass die Kohlenhydrate, Fette und Eiweissstoffe unserer Nahrung keine Formiatausscheidung veranlassen. Die Oxydation von Kohlen- stoffketten, z. B.  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$  . . . , erfolgt daher sicher nicht in der nächstliegenden einfachen Art, dass vom leichter angreifbaren Ende der Kette ab ein Kohlenstoff nach dem anderen abgelöst und jeder einzeln oder doch der zum Schluss verbleibende  $\text{CH}_3$ -rest erst zu Ameisensäure, dann zu Kohlensäure oxydirt wird, denn in diesem Falle müsste der Harn regelmässig erhebliche Quantitäten Formiat enthalten.

#### V. Stätte der Oxydation im Thierkörper.

Zur Bestimmung der oxydativen Leistungsfähigkeit der Einzel- organe wurden bislang vorwiegend Stoffe der aromatischen Reihe in Verwendung gezogen, speciell sind, nach Untersuchungen Schmiede- berg's und seiner Schüler, Aldehyde der aromatischen Reihe hierzu besonders geeignet. Stoffe der Fettreihe, die den Körpergeweben in gewissem Sinne doch adäquater sind, hat man in dieser Richtung weit seltener verfolgt. So haben — mit negativem Erfolg — Nencki und Sieber<sup>1)</sup> derartige Versuche über die Oxydationsmöglichkeit des Traubenzuckers gemacht, ferner Pellacani (l. c.) das Formiat in gleicher Richtung untersucht.

Ich wählte zu dieser Versuchsreihe Methylalkohol und Form- aldehyd, weil sich hier die Grösse der erfolgten Oxydation durch Bestimmung der gebildeten Ameisensäure annähernd quantitativ fest- stellen lässt.

Um jene Organe kennen zu lernen, in denen sich die Alkohol- und Aldehydoxydation am stärksten vollzieht, wären Versuche am überlebenden Organ mit künstlicher Durchblutung, etwa in der Art, wie sie M. v. Frey und Gruber<sup>2)</sup> oder Jacobj<sup>3)</sup> angewandt haben, besonders erwünscht gewesen. Da mir die hierzu nothwen- digen Apparate nicht zur Verfügung standen und nicht beabsichtigt war, das Maximum der chemischen Leistung, sondern vielmehr nur das relative Verhältniss der Betheiligung der einzelnen Organe bei

1) Journal f. prakt. Chemie. Bd. XXVI. S. 1.

2) Du Bois' Arch. 1885. S. 519.

3) Archiv f. exp. Path. u. Pharm. Bd. XXVI. 388.

der Oxydation zu bestimmen, so habe ich einfach das — womöglich dem eben getödteten Thier entnommene — Organ zerkleinert, den Organbrei in einer Glasbüchse mit einer Lösung der betreffenden Substanz in physiologischer Kochsalzlösung übergossen, tüchtig durchgeschüttelt, durch 3—4 Stunden im Brütöfen oder Wasserbad bei 37—39° digerirt, dann kolirt, 3—4 mal nachgewaschen, die Kolatur mit Phosphorsäure angesäuert und aus grossen Kolben destillirt. Im Destillat wurde das Oxydationsproduct, in unserem Falle Ameisensäure, quantitativ bestimmt.

Da sich Formaldehyd bei alkalischer Reaction schon durch Digestion bei obiger Temperatur unter Ameisensäurebildung zersetzt, so wurde in den Oxydationsversuchen mit Aldehyd, wo unveränderter Aldehyd ins Destillat übergeht, wie in den Versuchen XV und XVI, das Einengen der Destillate bei neutraler oder schwach alkalischer Reaction (Neutralisation mit Calciumcarbonat) vorgenommen. Ausserdem wurde bei diesen Versuchen stets ein Parallelversuch in der Weise durchgeführt, dass ein bestimmtes Volumen der Aldehydlösung, mit kohlensaurem Natron versetzt, die gleiche Zeit wie die Organe im Brütöfen gehalten wurde; dann wurde angesäuert und das gebildete Formiat bestimmt. Der erhaltene Werth war bei Schätzung der durch das Organ gebildeten Formiatgrössen in Abzug zu bringen. Die Versuche wurden absichtlich ohne Hinzufügen besonderer fäulnisshemmender Substanzen durchgeführt, da dieselben auch das Oxydationsvermögen des überlebenden Gewebes hätten beeinträchtigen können. Die kurze Dauer der Versuche, sowie Controlversuche, bei denen die Organe aufgeköcht, dann ohne Maassregeln gegen das Hineingelangen von Gährungserregern an der Luft abgekühlt und genau denselben Proceduren, aber mit negativem Erfolg unterworfen wurden, machen einen Einwand nach dieser Richtung gegen die Auffassung der erhaltenen Oxydationsproducte als Leistungen der überlebenden Zellen hinfällig; dazu kommt überdies, dass Formaldehyd, wie Loew<sup>1)</sup> nachgewiesen, noch in ausserordentlicher Verdünnung niedrigere Organismen tödtet.

Das geringe Gewicht der Organe des Hundes, selbst dann, wenn man mehrere grössere Thiere gleichzeitig zu einem Versuche opfert, zwangen, einen Theil dieser Versuche an aus dem Schlachthaus bezogenen Organen, die natürlich dem eben getödteten Thier entnommen wurden, durchzuführen. Meist wurden die Organe noch lebenswarm ins Laboratorium gebracht.

1) Maly's Jahrbuch. Bd. XVIII. S. 272.

Im Vorhinein sei bemerkt, dass Formiat von der isolirten überlebenden Leber nicht oder fast nicht angegriffen wird. Fügte ich Formiat zu zwei Leberproben, von denen ich eine durch Stunden im Brüttofen hielt und dann erst auf Formiat arbeitete, während die andere sofort kolirt, ausgewaschen und destillirt wurde, so findet man in beiden Fällen procentisch fast die gleichen Formiatmengen wieder.

Die folgende Tabelle enthält die mit  $\frac{1}{2}$  und 1 proc. Lösung von Methylalkohol und Formaldehyd angestellten Versuche. Die in Tab 5 und 6 angeführten Zahlen bedeuten das Gewicht des gefundenen Calomels, welches deswegen nicht in Formiat umgerechnet wurde, weil die entsprechenden Werthe durchschnittlich sehr klein sind.

- *Tabelle über Oxydationsversuche mit überlebenden Organen.*

A. Methylalkohol.

Organ	Versuchsnummer	Thierart	Organmenge und Substanzmenge	Gewonnenes Calomel in g	Calomel auf 500 g Organ berechnet	Bemerkungen
Muskel	25	Hund	500 g	0,0466	0,0466	
			500 g + 500 cem 1 Proc. Methylalkohol	0,1260	0,1200	
Leber	26	"	100 g	0,0498	0,2490	Calomel nicht ganz rein.
			100 g + 150 cem 1 Proc. Methylalkohol	0,1303	0,4340	
"	27	Rind	200 g	0,0097	0,0245	
			380 g + 400 cem 1 Proc. Methylalkohol	0,6304	0,8196	
"	28	"	200 g	0,0240	0,060	
			250 g + 200 cem 1 Proc. Methylalkohol	0,0412	0,082	
"	29	Pferd	500 g + 500 cem 1 Proc. Methylalkohol	0,1595	0,1595	fehlt d. Controlversuch.
Niere	30	Rind	200 g	0,015	0,0375	
			300 g + 1 Proc. Methylalkohol	0,0342	0,0543	

B. Formaldehyd.

Muskel	31	Hund	500 g	0,0466	0,0466	
			500 g 1 proc. Aldehydlösung + 1 g kohlen-saures Natron	0,0555	0,0555	
Leber	32	Pferd	500 g + 500 cem ders. Aldehydlösung	0,080	0,080	
			500 g	0,0107	0,0107	
			500 cem $\frac{1}{2}$ proc. Aldehyd + $\text{Na}_2\text{CO}_3$	0,0555	0,055	
			500 g + 500 cem $\frac{1}{2}$ proc. Aldehydlös.	0,1899	0,1899	

Organ	Versuchs- Nummer	Thierart	Organmenge und Substanzmenge	Gewonnenes Calomel in g	Calomel auf 500 g Organ berechnet	Bemerkungen
Leber	33	Pferd	500 g	—	0,1012	
			500 cem Aldehyd + Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	—	0,0555	
	34	-	500 g + 500 cem	—	1,2236	
			1/2 proc. Aldehydlösung.			
	35	Rind	500 g + 500 cem	—	0,1372	
			1/2 proc. Aldehydlösung.			
200 g			0,0097	0,0245		
500 cem 1 proc. Aldehyd + Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>			—	0,0579		
36	-	500 g + 500 cem	—	0,7262		
		1 proc. Aldehydlösung. 350 g durch 1/2 Std. gekocht	—	0,003		
36	-	200 g	0,024	0,060		
		400 g + 400 cem	0,4454	0,5668		
		1 proc. Aldehydlösung.				

Rindanieren und Pferdungen oxydiren nicht.

Ueberblickt man die gefundenen Zahlen, so tritt bei Anwendung von Formaldehyd eine unzweifelhafte oxydative Wirkung der Leber, weniger deutlich des Muskels hervor. Minder deutlich, bis auf Versuch 27, ist die Oxydation des Methylalkohols, doch spricht die Thatsache, dass in allen Fällen ein Plus bei Anwesenheit desselben gefunden wurde, dass ferner in den meisten Versuchen dieses Plus ausserhalb der Fehlergrenzen liegt, dafür, dass auch Methylalkohol von den Zellen überlebender Organe angegriffen werden kann.

Hiermit erscheint die Fähigkeit überlebender Organe, Fettkörper zu oxydiren, die zuerst von Pellacani auf Grund von Versuchen mit Formiat behauptet worden ist, für den Formaldehyd und den Methylalkohol erwiesen.

Die Hauptergebnisse der vorstehenden Untersuchung lassen sich in folgende Sätze zusammenfassen:

1. Die physiologische Wirkung des Methylalkohols unterscheidet sich von jener des Aethylalkohols dadurch, dass der zuerst auftretenden Paralyse ein oft Tage lang andauerndes comatöses Intoxicationsstadium folgt.

2. Die Ausscheidung der im Körper aus Methylalkohol entstandenen Ameisensäure erreicht erst am 3. oder 4. Tage nach der Vergiftung ihr Maximum. Diese protrahierte Ausscheidung ist nicht auf eine Zurückhaltung des bereits gebildeten Formiats zu beziehen, sondern

kann nur auf einem längeren Verweilen des Methylalkohols selbst oder weiterer unbekannter Umwandlungsproducte desselben im Thierkörper beruhen.

3. Die physiologische Wirkung des Formaldehyds, die sich als sehr starke locale und allgemeine Reizwirkung darstellt, widerspricht der Vermuthung, dass bei der Oxydation des Methylalkohols je nach beträchtliche Mengen Formaldehyd auftreten.

4. Wie der Methylalkohol gehen auch Ester desselben, Methylamin, Oxymethansulfonsäure, Formaldehyd im Körper zum Theil in Ameisensäure über, Da nach Aethylalkohol, Aceton und anderen Derivaten der Fettreihe keine Ameisensäure auftritt, so ist die Bildung eines der genannten oder eines analogen Methylderivates als Zwischenproduct der normalen Oxydation nicht anzunehmen.

5. Auch die überlebenden Einzelorgane des Thierkörpers besitzen theilweise die Fähigkeit Methylalkohol, in erhöhtem Masse aber Formaldehyd, zu oxydiren. In dieser Beziehung erweist sich vor Allem die Leber der Warmblüter als wirksam.

Prag, Weihnachten 1892.



1000) Pohl J.

Ueber die Oxydation des Methyl Und Aethylalkohols im Thierkorper.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch exp Path Pharmak. 1893;31:281-302.

METHANOL

/WOW

/ETHANOL

TOXICITY

/BISULPHITE

/CHRONIC

While ethyl isobutyl and even amyl alcohol could be given to animals in doses sufficient to cause intoxication for months and even almost a year without causing marked anatomical or functional disturbances, methyl alcohol when given in small doses every other day was tolerated for a few weeks; the animals remaned comatose for days, did not eat and died even though the administration of the alcohol was discontinued. worked with dogs and rebits. The administratio of sodium bisulphite simultanwously with methyl alcohol caused a great increase in the excretion of formic acid in the urin.