

Ueber ein Verfahren zur völligen Abscheidung des Eiweisses aus thierischen Flüssigkeiten.

Von Dr. **Franz Hofmeister**, Assistenten der Lehrkanzel für medicinische Chemie in Prag.

(Aus dem medicinisch-chemischen Laboratorium in Prag.)
(Der Redaction zugegangen am 7. August.)

Will man aus thierischen Flüssigkeiten das darin vorhandene Eiweiss möglichst vollständig abscheiden, so bedient man sich hiezu in der Regel des Ausfällens in der Siedehitze unter gleichzeitigem vorsichtigem Säurezusatz. Dieses Verfahren leidet jedoch an dem Uebelstande, dass es selten oder nie ein wirklich eiweissfreies Filtrat liefert. Ist auch die der Fällung entgangene Eiweissmenge eine so geringe, dass sie für gewöhnlich vernachlässigt werden kann, so kommen doch anderseits Fälle vor, in denen der Zweck der Untersuchung die völlige Entfernung des Eiweisses erheischt. Es hat auch nie an Vorschlägen gefehlt, die dieses Ziel im Auge hatten, — ich erwähne davon: die Ueberführung des Eiweisses in Protein und Fällung durch Neutralisiren in der Kälte, Zusatz von Neutralsalzen zu der angesäuerten kochenden Flüssigkeit, Fällung mit Alkohol oder mit Bleizucker, Kochen mit neutralem essigsauerm Eisenoxyd — allein keines dieser Verfahren hat in der Praxis allgemeinere Verwendung gefunden. Dies erklärt sich aus dem Umstande, dass die angeführten Methoden grossentheils dem angestrebten Zwecke nicht genügten ¹⁾, oder aber, wenn dies der Fall, doch eine

¹⁾ Man vergleiche, um nur ein Beispiel anzuführen, die der jüngsten Zeit angehörende Arbeit von Drosdoff (Zeitschr. f. phys. Chemie Bd. I. S. 216). Um eine vollständige Trennung von Eiweiss und Peptonen zu erzielen, bediente sich Drosdoff vorsichtshalber gleichzeitig drei verschiedener Methoden der Eiweissabscheidung. Ein Blick auf die mitgetheilten Versuchstabellen lehrt jedoch, dass keine derselben ihrem Zweck vollständig entsprach, denn die von ihnen gelieferten Flüssigkeiten gaben in mehreren Fällen mit Ferrocyankalium Opalescenzen, einmal sogar Niederschlag.

beträchtliche Verunreinigung der eiweissfreien Filtrate durch die zugesetzten Reagentien zur Folge hatten. Von diesem Uebelstande ist auch das von Hoppe-Seyler¹⁾ empfohlene Kochen mit neutralem essigsauren Eisenoxyd nicht gänzlich freizusprechen, da es Filtrate ergibt, die kein Eiweiss, wohl aber eine, wenn gleich geringe Menge Eisen und nicht unbedeutliche Quantitäten Essigsäure enthalten, ein Umstand, der namentlich, wenn es sich um grosse Flüssigkeitsvolumen handelt, schwer ins Gewicht fällt.

In der nachstehend mitgetheilten Behandlung mit gewissen Metalloxyden glaube ich nun ein Verfahren gefunden zu haben, das dem angestrebten Zwecke völlig entspricht, die erwähnten Mängel thunlichst vermeidet.

Die eiweisshaltige Lösung wird zunächst in der gebräuchlichen Weise von der Hauptmenge des Eiweisses befreit, darauf das Filtrat mit Bleihydrat versetzt, einige Minuten im Kochen erhalten und wieder filtrirt. Die erhaltene Flüssigkeit wird durch Einleiten von Schwefelwasserstoff von gelöstem Blei, durch Aufkochen von überschüssigem Schwefelwasserstoff befreit und erweist sich nun auch den empfindlichsten Reagentien gegenüber als eiweissfrei.

Enthält die ursprüngliche Lösung schwefelsaure oder phosphorsaure Salze in grosser Menge, so empfiehlt es sich, vor dem Kochen mit Bleihydrat einige Tropfen einer Bleizuckerlösung zuzusetzen. Das Bleioxyd macht nämlich aus den Sulfaten und Phosphaten die Alkalien frei, welche, wenn in grösserer Quantität vorhanden, einen, wenn gleich sehr geringen Antheil des Eiweisses in Form von Albuminat in Lösung erhalten. Zusatz von Bleizucker führt sie in essigsaure Salze über und macht sie so unschädlich.

Dass es sich so verhält, zeigt eckant nachstehender Versuch. Kocht man eine concentrirte Peptonlösung mit Bleioxyd, die viel Sulfate oder Phosphate enthält, und setzt

¹⁾ Hoppe-Seyler, Handb. der phys. und path.-chem. Analyse, IV. Aufl. S. 226.

etwas Kupfersalz hinzu, so färbt sich die Flüssigkeit deutlich röthlich — (Biuretreaction); setzt man nun einige Tropfen Bleiacetat hinzu, so verschwindet die rothe Färbung sofort. Das freie Alkali, das die Biuretfärbung hervorgebracht hatte, wird somit von der Essigsäure des Bleizuckers gebunden.

Wie das frischgefällte Bleioxyd lassen sich auch andere Metallverbindungen zur völligen Abscheidung des Eiweisses verwenden. Einschlägige Versuche, die ich mit frischgefälltem kohlen-sauren Blei- und Zinkoxyd, sowie mit käuflichem reinen Zinkoxyd angestellt habe, gaben mir ganz befriedigende Resultate.

Die Ursache der Erscheinung, dass unter den gegebenen Verhältnissen das Eiweiss so vollständig in unlösliche Verbindungen übergeht, ist in dem Umstand zu suchen, dass durch die zugesetzten Metalloxyde (resp. Carbonate) die vorhandenen Säuren völlig gebunden werden, während anderseits die Flüssigkeit nur in soweit alkalische Reaction annimmt, als dies der Löslichkeit der angewandten Metallverbindungen entspricht. Unter diesen Verhältnissen kommen die vorhandenen Eiweisskörper in der Form von Metallsalzen völlig zur Abscheidung.

Auch bei dem von Hoppe-Seyler empfohlenen Kochen mit neutralem essigsauerm Eisenoxyd dürfte die völlige Abscheidung des Eiweisses auf Bindung desselben durch das beim Kochen sich abscheidende eisenoxydreiche Acetat beruhen.

Im Nachfolgenden gebe ich die Resultate mit verschiedenen thierischen Flüssigkeiten ausgeführter Versuche, deren Hauptzweck war, die Verwendbarkeit des erörterten Ausfällungsverfahrens klar zu stellen.

Daneben richtete ich jedoch mein Augenmerk gleichzeitig auf das mehrfach behauptete Vorkommen von Peptonen in einigen der untersuchten Flüssigkeiten, zu dessen Nachweis die von mir vielfach gemachte Beobachtung, dass neben Eiweiss vorhandene peptonartige Substanzen beim Kochen mit Metalloxyden zum grössten Theil ins Filtrat übergehen, die günstigste Handhabe bot.

Bevor ich zur Wiedergabe der Versuche schreite, muss ich einiges betreffs der Reactionen erwähnen, deren ich mich zum Nachweis minimaler Eiweissmengen bediente. Es sind dies nur zum Theil die allgemein gebräuchlichen. Meist gab ich den von Brücke zuerst zum Nachweis und zur Abscheidung von Proteinstoffen benützten Alkaloidreagentien den Vorzug, da sie an Empfindlichkeit alle anderen bekannten Reagentien übertreffen.

Da diese Thatsache nicht allgemein bekannt sein dürfte, so theile ich zunächst einige vergleichende Versuche mit, die die Ueberlegenheit der genannten Reagentien beleuchten, zugleich aber einen Massstab abgeben für die in den später anzuführenden Versuchen erreichte Vollständigkeit der Eiweissabscheidung.

Zu diesem Zwecke fällte ich aus nativen albuminhaltigen Flüssigkeiten das Globulin durch vorsichtiges Ansäuern und Einleiten von Kohlensäure in die mässig verdünnte Lösung zu fast grössten Theile aus, bestimmte hierauf den Eiweissgehalt mit dem Polarimeter. (Die spezifische Drehung wurde dabei für das Serumweiß mit 60° ,¹⁾ für das Hühnerweiß mit $35,5^{\circ}$ angenommen.) Nunmehr verdünnte ich einzelne Proben entsprechend dem gefundenen Procentgehalt, indem ich dem weiteren Ausfällen von Globulin durch Zusatz von etwas kohlensaurem Natron vorbeugte.

1. Versuchsreihe. Aus Rinderblutserum wurden durch passende Verdünnung sechs verschiedene Lösungen dargestellt mit einem Gehalt von 1 Theil Eiweiss auf 1000, 2000, 10000, 50000 und 100000 Theile Wasser.

Von den untersuchten Reactionen erwies sich die Biuretreaction als die mindest empfindliche. In einer alkalisch gemachten Lösung von 1:2000 gab vorsichtiger Zusatz von Kupfersulfat noch röthliche Färbung, in einer Lösung von 1:10000 nicht mehr.

Zusatz von concentrirter Salpetersäure, sowie Kochen der mit concentrirter Kochsalzlösung und Essigsäure versetzten Flüssigkeit ergab noch bei 20000facher Verdünnung deutliche Trübung.

Bei derselben Concentration liessen sich nach Ausführung der Millon'schen Probe vereinzelt, sehr feine, roth gefärbte Flöckchen nachweisen, nicht aber in den verdünnteren Proben.

Ferrocyankalium, sehr vorsichtig zu der mit Essigsäure versetzten Lösung gesetzt, brachte noch in 50000facher Verdünnung merkliche Trübung hervor, nicht mehr deutlich aber bei 100000facher.

1) Vgl. Haas, Pflüger's Archiv, Bd. 12, S. 404.

Tannin, Phosphorwolframsäure (eigentlich eine mit Salzsäure versetzte, nach der Angabe von Scheibler¹⁾ bereitete Lösung von phosphorwolframsaurem Natron), Jodquecksilberkalium und Jodwismuthkalium (bereitet nach Fron²⁾) ergaben noch in der höchstverdünnten Lösung 1:100 000 merkliche Trübungen.

Bezüglich der drei letztgenannten Reagentien, die nur in saurer Lösung angewendet werden dürfen, sei bemerkt, dass ein Ueberschuss von Säure — die von mir verwendete war Salzsäure — die Reaction mit Phosphorwolframsäure nicht beeinträchtigt, wohl aber jene mit Jodquecksilber- und besonders mit Jodwismuthkalium, indem er den von ihnen hervorgebrachten Niederschlag merklich löst.

Die sog. Xanthoproteinreaction (schwache Gelbfärbung beim Kochen mit Salpetersäure, stärkere bei nachträglichem Zusatz von Natronlauge) habe ich bei meinen Versuchen nicht berücksichtigt, weil dieselbe auch mit zahlreichen dem Eiweiss fernstehenden, namentlich aromatischen Körpern zu Stande kommt, — ich erinnere dabei an die Bildung von Pikrinsäure und Styphninsäure — somit keine unzweideutigen Resultate liefert.

2. Versuchsreihe. Eiereiweiss wurde wie oben das Serum-eiweiss behandelt und eine Reihe von Proben entsprechend der durch den Polarimeter gefundenen Concentration in gleichen Verhältnissen verdünnt.

Die mit den einzelnen Reagentien ausgeführten Versuche ergaben eine ebenso grosse Empfindlichkeit derselben gegen Eiereiweiss wie oben gegen Hühnereiweiss, wesshalb ich von ihrer Wiedergabe absehe.

Eine gleiche wo nicht noch grössere Empfindlichkeit zeigten sie gegen Peptonlösungen.

3. Versuchsreihe. Eine bei 130° getrocknete Probe von Leimpepton (dargestellt durch andauerndes Kochen von Gelatine), wurde in dem 100fachen Gewicht Wasser gelöst und einzelne Proben dieser Lösung in ähnlicher Weise verdünnt wie oben beim Eiweiss. Wiederum erwies sich die Biuretprobe als die relativ am wenigsten empfindliche, da sie schon bei einer Verdünnung von 1:10000 im Stiche liess. Von den übrigen Reagentien gab Jodwismuthkalium in einer Lösung von 1:100 000 nur noch eine Spur einer Reaction, während Tannin, Phosphorwolframsäure und Jodquecksilberkalium noch in einer Concentration von 1:200 000 zwar sehr schwache, aber unverkennbare Trübungen erzielten.

4. Versuchsreihe. Fibrinpepton, durch künstliche Magenverdauung erhalten, eiweissfrei, bei 130° getrocknet, wurde in 100 Theilen Wasser gelöst und entsprechend verdünnt. Es bot in seiner Empfindlichkeit gegen Reagentien in allen Stücken das gleiche Bild dar wie das Leimpepton.

1) Scheibler, Chem. Centralbl. 1872, S. 709.

2) Fron, Chem. Centralbl. 1875, S. 263.

In Betreff der sogenannten Biuretprobe will ich hier beiläufig bemerken, dass die vielfach verbreitete Annahme, sie wäre für die peptonartigen Körper allein charakteristisch, ein Irrthum ist, der dem Umstand zuzuschreiben ist, dass in der Regel die zur Untersuchung gelangenden Lösungen der Peptone wegen deren ungewöhnlichen Löslichkeit viel concentrirter sind, als die genuinen einem weiteren Einengen nur schwer zugänglichen Eiweisslösungen. In Wirklichkeit ist das Verhalten gegen Alkali und Kupfersalz bei beiden Körpern das gleiche. Dies geht aus einem Vergleich der in vorstehenden Versuchen erhaltenen Proben hervor, und lässt sich noch augenfälliger an sehr concentrirten Eiweisslösungen, z. B. unverdünntem Hühnereiweiss demonstrieren, bei denen der charakteristische, der zugesetzten Kupfermenge entsprechende Farbenwechsel vom Rosenroth durch intensives Purpurroth zu Blauviolett ebenso deutlich zu Tage tritt, wie bei entsprechend concentrirten Lösungen von Peptonen oder Leim.

Aus den angeführten Versuchsreihen ergibt sich:

1. Flüssigkeiten, die weder durch Ferrocyankalium und Essigsäure, noch durch die Alkaloidreagentien (unter diesem Namen will ich der Kürze wegen nachstehende Reagentien zusammenfassen: Phosphorwolframsäure,¹⁾ Jodquecksilberkalium, Jodwismuthkalium und Gerbsäure) gefällt werden, sind gänzlich frei von Eiweiss und Peptonen.

2. In Flüssigkeiten, die mit Ferrocyankalium nicht, wohl aber mit den angeführten Alkaloidreagentien Niederschläge geben, ist die Anwesenheit peptonartiger Substanzen mit grosser Wahrscheinlichkeit anzunehmen.²⁾

Die thierischen Flüssigkeiten, an denen ich die fällende Wirkung der Metalloxyde prüfte, waren: 1. Ascitesflüssigkeit, 2. Blut, 3. Milch, 4. Hühnereiweiss, 5. Eiter.

1. Ascitesflüssigkeit. Durch Punction erhalten, nach der polarimetrischen Bestimmung ungefähr 2,5 % Eiweiss enthaltend. Zwei Proben wurden auf das fünffache Volum verdünnt und unter Essigsäurezusatz in der Siedehitze ausgefällt. Die resultirenden Filtrate waren völlig wasserklar, gaben aber trotzdem sehr deutliche Eiweissreactionen: Trü-

¹⁾ Ganz analog wie dieses Reagens verhält sich auch Phosphormolybdänsäure.

²⁾ Manche in thierischen Flüssigkeiten vorkommende Substanzen geben nämlich mit einzelnen dieser Reagentien Niederschläge; so Kreatinin mit Phosphorwolframsäure, Xanthin mit Phosphormolybdänsäure.

lung beim Kochen mit Essigsäure und concentrirten Neutralsalzen, kleine rothe Flöckchen bei der Millon'schen Probe, starke Trübungen mit Ferrocyankalium und den Alkaloidreagentien.

Dieselben Filtrate wurden in getrennten Portionen mit Bleioxyd, kohlensaurem Blei, kohlensaurem Zink und Zinkoxyd versetzt und gekocht. Die von den betreffenden Metallen mittelst Schwefelwasserstoff befreiten Filtrate gaben jetzt mit den angeführten Reagentien durchaus negative Resultate. Sie waren eiweiss- und peptonfrei.

2. Blut. Von zwei Proben ganz frischen Schafblutes wurde nach einer halben Stunde das Serum abgegossen, in gewöhnlicher Weise ausgefällt, die Filtrate mit Bleioxyd und einigen Tropfen Bleizuckerlösung versetzt und gekocht. In den Filtraten war mit keinem Reagens auch nur eine Spur von Eiweiss oder Pepton zu entdecken.

Ferner habe ich fünf Proben Schafblut 48 Stunden sich selbst überlassen, um zu sehen, ob nicht durch die im Blute bei längerem Stehen eintretende Zersetzung Peptone gebildet würden. Allein auch in diesem Fall war das Ergebniss negativ, was um so bemerkenswerther ist, als eine der Proben bereits einen entschieden fauligen Geruch zeigte.

3. Milch. In 5 Proben frischer Kuhmilch, die zunächst mit Essigsäure gefällt, dann in der beschriebenen Weise mit Bleioxyd und etwas essigsauerm Blei behandelt worden waren, fand sich in den Filtraten auch nicht eine Spur von durch die obigen Reagentien fällbarer Substanz. (Sind die Filtrate sehr stark eingengt, so kann Gerbsäure durch Fällung der reichlich vorhandenen Kalksalze eine Trübung hervorbringen). Fünf andere Portionen von denselben Milchproben wurden nun einige Tage stehen gelassen, bis sie sauer wurden und gerannen. Die Untersuchung kleinerer Theile derselben ergab bis zum Eintritt der Gerinnung das gleiche negative Resultat, wie bei den frischen Proben. In den aus der geronnenen Milch nach der Bleibehandlung erhaltenen Filtraten brachten jedoch die Alkaloidreagentien Fällungen hervor, die um so intensiver wurden, je länger die

sauer gewordene Milch vorher gestanden hatte. Dass diese Niederschläge nicht von Eiweiss herrührten, zeigte das Verhalten gegen Ferrocyankalium, welches auch in diesen Proben nicht eine Spur einer Trübung hervorbrachte. In der frischen Milch waren somit keine Peptone nachweisbar, wohl aber in der sauer gewordenen.

Beachtenswerth scheint mir die bei Milch in allen Fällen gemachte Beobachtung, dass die eiweiss- und peptonfreien Flüssigkeiten mit salpetersaurem Quecksilberoxyd reichliche Niederschläge gaben, die sich unter Umständen auf Zusatz von salpetrigsaurem Kali beim Kochen rötheten.

Bei der Zusammensetzung des von Millon und Comaille als Lactoprotein bezeichneten Gemenges kommt somit ausser unangefällten Resten von Casein und Albumin und etwa vorhandenen Peptonen noch ein von diesen verschiedener Körper in Betracht, der nach vorläufig angestellten Versuchen ausser der Millon'schen Probe keine der für die Proteinkörper charakteristischen, wohl aber mehrere den Amidosäuren eigenthümliche Reaktionen darbietet.

Wie die Kuhmilch ergab auch die sonst so schwierig zu behandelnde Frauenmilch nach der Bleibehandlung eiweiss- und peptonfreie Filtrate (dreimal in 3 Versuchen).

4. Hühnereiweiss. Die verdünnte mit Bleioxyd behandelte Lösung lieferte Filtrate, die sich weder mit Ferrocyankalium, noch mit den Alkaloidreagentien trübten.

5. Eiter. Aus einem Empyem durch Punction entleerter, 24 Stunden alter, aber kein Zeichen von Zersetzung darbietender Eiter wurde auf dem Wasserbad coagulirt, das Filtrat mit Blei behandelt.

Die schliesslich erhaltene blei- und schwefelwasserstofffreie Flüssigkeit gab keine Trübung mit Ferrocyankalium, wohl aber starke flockige Niederschläge mit den Alkaloidreagentien, sowie eine sehr deutliche Millon'sche Probe. Sie enthielt somit kein Eiweiss, wohl aber reichlich eine peptonartige Substanz.

Die vorstehend mitgetheilten Versuche dürften die Brauchbarkeit des empfohlenen Verfahrens genügend klar stellen. In keinem Falle liess die Vollständigkeit der Eiweissabscheidung etwas zu wünschen übrig. In wie weit sich dasselbe beim Nachweis und zur Reindarstellung der Peptone verwenden lässt, darüber sind bereits Untersuchungen im Gange.