

Ueber das Verhalten des Serumalbumins zu Säuren und Neutralsalzen.

Von

J. E. Johansson.

(Aus dem Laboratorium für medicinische Chemie in Upsala.)
(Der Redaction zugegangen am 3. Januar 1885.)

Im seinem Aufsätze «Ueber die Anwendbarkeit des Magnesiumsulfates zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Serumalbumin und Globulinen» (diese Zeitschrift, Bd. VIII) hat Prof. Hammarsten der grossen Resistenz des Serumalbumins gegen die Einwirkung von Säuren bei gleichzeitiger Gegenwart von Salzen Erwähnung gethan, und er hat daselbst auch die Mittheilung gemacht, dass dieses Verhalten des Serumalbumins als Ausgangspunkt für eine neue Methode zur Reindarstellung von diesem Eiweissstoffe benutzt werden könne. Durch Arbeiten anderer Art verhindert, selbst diese Frage weiter zu verfolgen, forderte er mich auf, das Verhalten des Serumalbumins zu Säuren und Neutralsalzen etwas eingehender zu studiren.

Mit dieser Aufgabe beschäftigt, hatte ich die Arbeit schon am Ende Mai d. v. J. so weit gebracht, dass ich meine Versuchsergebnisse der hiesigen medicinischen Gesellschaft vorlegen konnte. Bevor ich aber zur Veröffentlichung meiner Arbeit ging, war es doch nöthig, die einschlägige Litteratur durchzuforschen, und ich wurde dabei von Prof. Hammarsten auf eine vor mehreren Jahren erschienene Arbeit von Eichwald aufmerksam gemacht. In dieser Arbeit¹⁾ theilt der genannte Forscher mehrere Beobachtungen mit, welche

¹⁾ Beiträge zur Chemie der gewebbildenden Substanzen und ihrer Abkömmlinge, H. I, Berlin 1873.

die Resistenz des Serumalbumins gegen Säuren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Neutralsalzen zeigen sollen. Es ist allerdings wahr, dass Eichwald, welcher mit noch paraglobulinhaltigem, mit NaCl nur halbgesättigtem Zehntelserum gearbeitet hat, die Resistenz des Serumalbumins gegen Säuren und Salzen nicht in ganz exakter Weise beweisen konnte; aber die Versuche sind trotzdem doch so überzeugend, dass über die Richtigkeit seiner Angaben kein Zweifel bestehen kann. Eichwald spricht sogar die Vermuthung aus, dass die Neutralsalze, indem sie das Albumin ausfällen, die Umwandlung desselben in Acidalbumin verzögern oder verhindern, und er hat auf seinen Beobachtungen eine neue Methode zur Reindarstellung des Serumalbumins gegründet. Diese Methode, welche wesentlich von der von Prof. Hammarsten angegebenen abweicht, dürfte doch zur Gewinnung von einem reinen Serumalbumin nicht geeignet sein.

Die Resistenz des Serumalbumins gegen Säuren und Neutralsalzen ist also, wie es scheint, zuerst von Eichwald beobachtet und demonstriert worden. Ausser diesen Beobachtungen Eichwald's sind doch einige Beobachtungen über denselben Gegenstand auch von einem anderen Forscher veröffentlicht worden. Im Jahre 1881 hat nämlich F. Hofmeister in der Zeitschrift für analytische Chemie, Bd 20, S. 319, in einem Referate über die Arbeit Hammarsten's «Ueber das Paraglobulin» auch einige eigene Beobachtungen in allergrösster Kürze mitgetheilt. Diese Beobachtungen fallen im Wesentlichen mit denjenigen, welche Hammarsten in seiner letzten Arbeit veröffentlicht hat, zusammen. Hofmeister hatte nämlich gefunden, dass der aus einer mit $MgSO_4$ gesättigten Serumalbuminlösung durch Säurezusatz erzeugte Niederschlag nach nicht zu langem Stehen noch aus unverändertem Albumin besteht, und er hat dieses Verhaltens zur Darstellung globulinfreier Serumalbuminlösungen mit Vortheil sich bedient. Dass diese Angaben Hofmeister's von Hammarsten übersehen worden sind, liegt daran, dass sie nur beiläufig in einem Referate mitgetheilt und nicht in einer Originalabhandlung veröffentlicht wurden.

Die Resistenz des Serumalbumins gegen Säuren und Neutralsalzen ist also schon früher von anderen Forschern, erst von Eichwald und dann auch von Hofmeister, beobachtet worden. Dagegen sind meines Wissens bisher keine Versuche, welche diese Resistenz in exakter Weise zeigen, veröffentlicht worden, denn die Versuche von Eichwald lassen in dieser Hinsicht noch viel zu wünschen übrig, und Hofmeister hat in dem obenerwähnten Referate nur die Thatsache selbst in allergrösster Kürze, ohne irgend welche Versuche anzuführen, mitgetheilt. Die Angaben dieser Forscher scheinen übrigens auch von anderen übersehen worden zu sein, und so findet man z. B. noch in der letzten Auflage von Hoppe-Seyler's Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse (vom Jahre 1883) die bisher allgemein verbreitete Angabe, dass das Serumalbumin bei Gegenwart von Salzen schon von sehr kleinen Säuremengen in Acidalbumin übergeführt wird. Bei dieser Sachlage dürfte es wohl berechtigt sein, einige der von mir über diesen Gegenstand ausgeführten Versuche hier mitzutheilen.

Eine Umwandlung des Serumalbumins in Acidalbumin macht sich bekanntlich dadurch kund, dass die Lösung nunmehr bei Zusatz von Alkali zu neutraler Reaction gefällt wird. Ebenso wird aus einer solchen, neutralisirten Lösung durch Sättigung mit einem Neutralsalze (z. B. $MgSO_4$) das bei der Neutralisation vielleicht in Lösung gebliebene Albuminat vollständig gefällt, während die unveränderte Serumalbuminlösung bekanntlich dadurch nicht im Geringsten gefällt wird. Dasselbe Reagens ist auch bekanntlich ebenso gut anwendbar, wenn es um den Nachweis von etwa neugebildetem Globulin sich handelt, während bei dem ersten Verfahren — dem Neutralisiren — das neugebildete Globulin von dem bei der Neutralisation entstandenen Neutralsalze in Lösung gehalten werden kann.

Um eine etwaige Umwandlung des Serumalbumins in Acidalbuminat, resp. Globulin, nachweisen zu können, verfuhr ich aus diesem Grunde in der Weise, dass ich die Lösung des mit Säure allein, resp. mit Säure und Salz be-

handelten Serumalbumins theils neutralisirte, theils nach erfolgter Neutralisation mit $MgSO_4$ sättigte. Dabei prüfte ich natürlich auf dieselbe Weise zuerst die ursprüngliche Serumalbuminlösung, welche bei richtiger Darstellung von den genannten Reagentien gar nicht gefällt wurde.

Ich lasse hier zuerst drei Versuche folgen, welche das Verhalten des Serumalbumins zu Säuren verschiedener Stärke zeigen.

Versuch I. Eine Lösung von Serumalbumin von Rindsblut wurde theils mit Essigsäure, theils mit Salzsäure in den folgenden Verhältnissen versetzt. Die Serumalbuminlösung enthielt ursprünglich 1,62% Albumin, und die Stärke der zugesetzten Säure wurde stets so gewählt, dass die Verdünnung überall dieselbe war. Die fünf ersten Proben wurden alle bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

- Nr. 1. Mit 10% Essigsäure blieb während mehr als 1 Monat unverändert.
- Nr. 2. Mit 20% Essigsäure ebenso.
- Nr. 3. Mit 0,25% HCl ebenso.
- Nr. 4. Mit 0,5% HCl. Eine theilweise Umwandlung in Acidalbuminat fand nach Verlauf von 16 Tagen statt.
- Nr. 5. Mit 10% HCl. Dieselbe Umwandlung fand nach 8 Tagen statt.
- Nr. 6. Mit 0,25% HCl. Diese Probe wurde bei 40° C. digerirt, wobei die Digestion täglich etwa 10 Stunden fortgesetzt wurde. Erst nach 14 Tagen war ein theilweiser Uebergang des Serumalbumins in Acidalbuminat bemerkbar.

Des Vergleichens halber wurde auch eine 7. Probe genommen, welche nicht mit Säure, sondern statt dessen mit Natronlauge bis zu 0,2% NaOH versetzt wurde. Hier war das Resultat ein ganz anderes, denn schon nach 2½ Stunden hatte in dieser Probe eine deutliche Umwandlung in Alkalbuminat stattgefunden.

Während also das Serumalbumin bei Zimmertemperatur eine bedeutende Widerstandsfähigkeit gegen verdünnte Essigsäure oder Salzsäure zeigt, wird es dagegen sehr rasch von selbst sehr verdünnter Natronlauge in Alkalbuminat übergeführt. Bemerkenswerth ist es auch, dass selbst bei der Einwirkung von so kleinen Alkalimengen eine Abspaltung

nicht nur von Schwefel sondern auch von Stickstoff, und zwar als Ammoniak, stattfindet. Bei Einwirkung von stärkerer Alkalilauge, z. B. von 2% NaOH, findet eine noch reichlichere Ammoniakentwicklung bei Zimmertemperatur statt, und diese gleichzeitige Abspaltung von Schwefel und Stickstoff bei der Entstehung des Alkalialbuminats, zeigt also, dass das Serumalbumin dabei einer tiefgreifenden Veränderung unterliegt.

Versuch II. Von einer Lösung, welche 1,456% aus Rindsblutserum dargestelltes Serumalbumin enthielt, wurden folgende drei Proben genommen und mit Salzsäure versetzt. Alle drei Proben wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

- Nr. 1. Mit 1% HCl. Theilweise Umwandlung in Acidalbuminat erst nach Verlauf von 8 Tagen.
- Nr. 2. Mit 2% HCl. Theilweise Umwandlung in Acidalbuminat nach Verlauf von 24 Stunden.
- Nr. 3. Mit 3% HCl. Acidalbuminatbildung schon innerhalb 5 Stunden.

Versuch III. Die Lösung enthielt 1,634% Serumalbumin (aus Rindsblutserum). Der Versuch wurde bei einer Temperatur, welche nur wenig um + 40° C. schwankte, ausgeführt, und im Allgemeinen wurden die Proben etwa 10 Stunden täglich bei dieser Temperatur erwärmt.

- Nr. 1. Mit 0,25% HCl wurde innerhalb 1 Monat nicht verändert.
- Nr. 2. Mit 0,5% HCl wurde nach 9 Tagen theilweise in Acidalbuminat umgewandelt.
- Nr. 3. Mit 1,0% HCl } Beide Proben wurden erst nach Verlauf von
- Nr. 4. Mit 2,0% HCl } 3 Stunden beobachtet und es enthielten beide dann ziemlich grosse Mengen von Acidalbuminat.

Wie man aus dem Obigen ersieht, geht also, wie zu erwarten war, die Umwandlung in Acidalbuminat mit wachsenden Säuremengen, wie auch mit steigender Temperatur rascher von Statten. Bei Zimmertemperatur und bei einem Gehalte von 1—2% Essigsäure, resp. 0,25% Chlorwasserstoffsäure, kann doch das Serumalbumin während mehr als einen Monat unverändert bleiben, was wohl als eine grosse Widerstandsfähigkeit gegen die Einwirkung von Säuren betrachtet werden kann.

Die bisher mitgetheilten Versuche beziehen sich nur auf solche Serumalbuminlösungen, welche durch anhaltende Dialyse von Salzen oder Mineralbestandtheilen im Allgemeinen möglichst sorgfältig befreit worden waren, und ich werde nun auch ein paar Versuche mittheilen, welche die Resistenz des Serumalbumins gegen die combinirte Wirkung von Säuren und Salzen zeigen werden.

Versuch IV. Rindsblutserum wurde mit $MgSO_4$ bei etwa $+ 30^\circ C.$ gesättigt und bei dieser Temperatur filtrirt. Beim Erkalten schied sich eine reichliche Menge des Magnesiumsulfats wieder aus, und das davon getrennte Filtrat wurde zum Versuche angewendet. Von dem Filtrate wurden vier gleich grosse Proben abgemessen, von denen zwei, a und a' mit 0,5% und zwei andere, b und b', mit 1% Essigsäure versetzt wurden. Es traten dabei in allen Proben sogleich reichliche Niederschläge auf. Von diesen Proben wurden nun zwei, a und b, sogleich filtrirt, während die zwei anderen, a' und b', erst nachdem sie 2mal 24 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hatten, filtrirt wurden. Die Niederschläge aus den zwei Proben wurden alle auf dieselbe Weise behandelt. Sie wurden erst mit den Filtern zwischen Fliesspapier ausgepresst, dann von dem Papiere getrennt, in Wasser mit Alkali genau neutralisirt, wenn nöthig filtrirt, und das so gewonnene Filtrat durch energische Dialyse in künstlichen Wursthülsen von den Salzen befreit. Es schied sich dabei während der Dialyse keine Spur von Eiweiss aus, und da die Lösungen dann mit $MgSO_4$ gesättigt wurden, trat in keiner der vier Proben eine Fällung auf. Nur die Probe b', welche 48 Stunden mit 1% Essigsäure und dem Neutralsalze gestanden hatte, zeigte eine schwache Opalescenz, welche vielleicht als eine Andeutung einer beginnenden Veränderung aufzufassen war.

Versuch V. Zu diesem Versuche wurde ebenfalls mit $MgSO_4$ bei $+ 30^\circ C.$ gesättigtes und bei derselben Temperatur filtrirtes Rindsblutserum verwendet. Aus dem Filtrate schied sich wie gewöhnlich beim Erkalten eine reichliche Menge

Magnesiumsulfat aus, und erst das hiervon getrennte neue Filtrat wurde zum Versuche benutzt. Dieses Filtrat wurde nun zu zwei Versuchsreihen, A mit Salzsäure und B mit Essigsäure, verwendet. Die salzsäurehaltigen Proben enthielten resp. 0,25, 0,5 und 1% HCl. Die Proben mit Essigsäure enthielten resp. 0,5 und 1% Essigsäure. Jede Probe von einem bestimmten Säuregehalte wurde in vier gleich grosse Portionen getheilt, so dass die Einwirkung der Säure bei Zimmertemperatur nach Verlauf von resp. 3, 6, 10 und 14 Tagen beobachtet werden konnte. Die Niederschläge wurden wie in dem vorigen Versuche behandelt, nur mit dem Unterschiede, dass die abfiltrirten, ausgepressten, von dem Filtrum getrennten und in Wasser gelösten Niederschläge nach der sorgfältigen Neutralisation der Lösungen einer Dialyse nicht unterworfen, sondern direkt mit überschüssigem $MgSO_4$ behandelt wurden.

Das Ergebniss dieses Versuches war folgendes: In der Versuchsreihe B, welche die Proben mit Essigsäure und Magnesiumsulfat enthielt, konnte selbst nach 14tägiger Einwirkung von 1% Säure keine Umwandlung des Serumalbumins in Acidalbuminat oder Globulin nachgewiesen werden; es trat weder bei der Neutralisation der Lösung, noch bei ihrer Sättigung mit $MgSO_4$ eine Trübung auf. Dagegen war die Lösung, selbst wenn die Säure nur drei Tage eingewirkt hatte, nicht ganz wasserhell, sondern sehr schwach opalisirend.

In den Salzsäure enthaltenden Proben konnte nach Verlauf von zehn Tagen noch nicht die geringste Umwandlung des Serumalbumins in Acidalbuminat nachgewiesen werden. Nach Verlauf von vierzehn Tagen war doch in derjenigen Probe, welche 1% HCl enthalten hatte, eine theilweise, wenn auch sehr geringfügige, Umwandlung in Acidalbuminat nicht zu verkennen. Der abfiltrirte und ausgepresste, in Wasser fein zertheilte Niederschlag löste sich bei der Neutralisation nicht vollständig auf, sondern es blieb ein kleiner, ungelöster Rückstand auf dem Boden des Gefässes liegend. Die hiervon durch Filtration getrennte Flüssigkeit wurde doch von überschüssigem Magnesiumsulfat nicht gefällt, und es

hatte also jedenfalls nur eine sehr unbedeutende Umwandlung des Serumalbumins stattgefunden. Dagegen lieferten auch in dieser Versuchsreihe die mit Säuren behandelten Proben nach der Neutralisation keine ganz klare, sondern stets etwas (wenn auch sehr schwach) opalisirende Lösungen.

Die nun mitgetheilten Versuche zeigen also, dass das Serumalbumin lange nicht so rasch, wie man glauben sollte, in Acidalbumin übergeführt wird. Selbst nach 10tägiger Einwirkung von einer 1-procentigen Salzsäure auf die mit $MgSO_4$ gesättigte Serumalbuminlösung hatte noch keine bemerkbare Umwandlung in Acidalbuminat stattgefunden. Erst nach vierzehn Tagen war eine solche — wenn auch sehr geringfügige — Umwandlung bemerkbar, und wenn man sich vergewärtigt, dass in den oben mitgetheilten Versuchen I und II die Salzsäure (von 1 %) allein bei Abwesenheit von $MgSO_4$ eine Umwandlung in Acidalbuminat schon nach acht Tagen bewirkt hatte, so scheint es, als wäre die Angabe von Eichwald, dass das Salz die Umwandlung in Acidalbuminat verzögert, eine richtige und begründete.

Um das Serumalbumin auf Grundlage der nun mitgetheilten Beobachtungen darzustellen, kann man auf folgende Weise verfahren: Das Blutserum wird erst bei $+ 30^\circ C.$ mit $MgSO_4$ gesättigt und bei derselben Temperatur filtrirt. Nach dem Erkalten wird von dem auskrystallisirten Salze abfiltrirt, das Filtrat mit 0,5—1% Essigsäure versetzt (von 0,5% wird das Serumalbumin doch nur ziemlich unvollständig gefällt) und der Niederschlag nach einigen Stunden abfiltrirt. Der Niederschlag wird ausgepresst, in Wasser gelöst, die Lösung neutralisirt und von Neuem mit $MgSO_4$ gesättigt, wobei die bei der ersten Ausfällung in dem Serum vielleicht zurückgebliebenen Spuren von Globulin ausgefällt und entfernt werden können. Das Filtrat wird von Neuem mit Essigsäure gefällt, der Niederschlag ausgepresst, in wenig Wasser gelöst, die Lösung neutralisirt und einer energischen Dialyse unterworfen. Wenn die Lösung dabei sehr verdünnt wird, concentrirt man sie bei etwa $+ 40^\circ C.$ und dialysirt dann wieder. Aus der auf diese Weise gewonnenen Lösung kann das

Serumalbumin zuletzt, wie dies in der Abhandlung von Starke¹⁾ angegeben worden ist, mit Alkohol ausgefällt und in festem Zustande erhalten werden. Das so gewonnene Serumalbumin verhält sich, so weit ich gefunden habe, wie das nach der Methode von Starke dargestellte. Die Lösungen scheinen doch bisweilen etwas weniger klar zu sein, und es ist also doch nicht ganz unmöglich, dass das Serumalbumin durch die combinirte Wirkung von Säure und Salz eine Veränderung erlitten hat, wenn auch diese Veränderung nicht so weit geht, dass eine Umwandlung in Acidalbumin stattfindet. Vielleicht könnte die Untersuchung der specifischen Drehung Aufschluss hierüber geben. Eine solche Untersuchung hat doch bisher nur Zahlen gegeben, welche von dem vorher gefundenen Werthe der specifischen Drehung des Serumalbumins so wenig abweichen, dass die Differenz auf die Rechnung der unvermeidlichen Observationsfehler geschrieben werden kann. Unter solchen Verhältnissen dürfte wohl auch der obenerwähnten Opalescenz keine zu grosse Bedeutung beigemessen werden können.

Gegen die Brauchbarkeit der neuen Methode zur Reindarstellung des Serumalbumins kann übrigens theoretisch die Einwendung gemacht werden, dass durch das $MgSO_4$ bei Gegenwart von Säure nach der Erfahrung von Hofmeister auch die Peptone gefällt werden sollen. Die Spuren von Peptonen, die im Serum vorkommen, dürften doch wohl von so untergeordneter Bedeutung sein, dass sie die Anwendbarkeit der Methode wohl kaum beeinträchtigen können.

¹⁾ Vergl. Maly's Jahresberichte, Bd. 11.