

Zur Trennung der Albumosen von den Peptonen.

Von

Dr. Paul Müller

Aspirant.

(Aus dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung“ in Wien. Vorstand: Dr. E. Freund.)

(Der Redaction zugegangen am 3. August 1898.)

Bis vor kurzer Zeit war man, wenn es sich darum handelte, eine möglichst vollständige Trennung der Verdauungsalbumosen von den Peptonen zu bewerkstelligen, einzig und allein auf die von Kühne ausgearbeitete Methode angewiesen, welche bekanntlich in ihrer definitiven Form darin besteht, dass die betreffende Lösung mit Ammonsulfat in der Siedehitze erst bei nahezu neutraler, dann bei stark ammoniakalischer und endlich bei schwach essigsaurer Reaction gesättigt wird.

So wichtig und fruchtbar nun auch diese Methode für das Studium dieser Eiweisskörper und ihre Abgrenzung von einander geworden ist, so leidet sie doch an unleugbar grossen Uebelständen, welche bereits von verschiedener Seite hervorgehoben wurden und welche ihre praktische Anwendbarkeit wesentlich beeinträchtigen. Es sei nur auf die Unmöglichkeit hingewiesen, in dem albumosenfreien Filtrat direkt den Stickstoffgehalt zu bestimmen, in demselben mit Phosphorwölfraumsäure zu fällen: auf die auch theoretisch nicht immer erwünschte Nothwendigkeit, diese immerhin leicht veränderlichen Körper der Siedehitze, und noch dazu bei stark alkalischer Reaction, aussetzen zu müssen; endlich auf die grossen Unbequemlichkeiten, welche die zur Fällung nothwendigen bedeutenden Salzmengen an und für sich im Gefolge haben und deren Entfernung

wieder die Einwirkung höherer Temperaturen durch längere Zeit hindurch erfordert.

Der grösste Theil dieser Uebelstände, welcher auf der Verwendung gerade des Ammonsalzes beruht, wird nun zwar durch das zweite uns seit Kurzem zur Verfügung stehende, zuerst von Bömer¹⁾ im Jahre 1895 mitgetheilte und Anfangs des laufenden Jahres neuerdings von diesem Autor im Verein mit K. Baumann²⁾ genauer ausgearbeitete Trennungsverfahren, welches an Stelle des Ammonsalzes das Zinksalz setzt, mit einem Schlage behoben — es bleibt aber auch bei dieser Methode der Nachtheil der grossen Salzmengen, und zwar wegen der bedeutenderen Löslichkeit des Zinksulfates, noch in erhöhtem Maasse bestehen, so dass die weitere Verarbeitung der gewonnenen Fractionen, abgesehen von der Stickstoffbestimmung und Phosphorwolframsäurefällung, welche nach Bömer keinen Eintrag erleiden, zum Mindesten sehr erschwert ist.

Es erschien daher wünschenswerth, eine Trennungsmethode zu besitzen, welche einerseits die oben erwähnten Schwierigkeiten umgeht und andererseits nicht auf dem Principe des Aussalzens beruht, dabei aber eine ebenso vollständige Entfernung der Albumosen gestattet, wie die Kühne'sche und Bömer'sche Methode.

Nach verschiedenen Vorversuchen mit anderen Schwermetallsalzen, insbesondere mit dem Uranylacetat, durch welches sich der grösste Theil der Albumosen abscheiden lässt, verwendete ich Eisenhydroxyd, unter bestimmten, gleich näher zu erörternden Bedingungen, als Fällungsmittel.

Dass Eisenhydroxyd im Stande ist, Propepton zu fällen war schon Schmidt-Mühlheim³⁾ bekannt. Allein Neumeister⁴⁾ gibt an, dass die Fällung der Albumosen (speciell der

1) Bömer, Zeitschr. f. analyt. Chemie, Bd. XXXIV, 1895.

2) Baumann u. Bömer, Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel 1898 N. 2.

3) Schmidt-Mühlheim, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth. 1880, S. 30.

4) Neumeister, Zeitschr. f. Biolog. N. F. Bd. VI, S. 277 und Bd. VIII, S. 339.

Deuteroalbumosen) nach der Schmidt-Mühlheim'schen Methode nur eine sehr unvollständige sei, und Mathes¹⁾ hat diese Angabe an verschiedenen, rein dargestellten Albumosen (Deuteroalbumose und Heteroalbumose) nachgeprüft und sich derselben vollinhaltlich angeschlossen. Auch ich kann nach meinen Versuchen die Unzulänglichkeit des Schmidt-Mühlheim'schen Verfahrens nur bestätigen. Günstiger gestaltete sich jedoch das Resultat, wenn man, ohne Anwendung des essigsäuren Natrons, bei genügendem Zusatz von Eisenchlorid lediglich genau neutralisirte: es ergaben sich dabei Filtrate, welche beim Kochen mit Lauge und Bleiacetat keine Schwefelbleiabscheidung erkennen liessen und beim Aussalzen mit Ammonsulfat nur geringe, wenn auch deutliche Trübungen zeigten.

Da nun die durch das Eisenhydroxyd entstehenden Albumosenniederschläge, wie viele andere durch Schwermetalle erzeugte (vergl. die Angaben Herth's²⁾), schon in den geringsten Mengen überschüssiger Säure oder Lauge sehr leicht löslich sind, so lag die Vermuthung nahe, die Unvollständigkeit der Albumosenfällung nach der Schmidt-Mühlheim'schen Methode möchte nicht etwa im Wesen der Affinitäten dieser Eiweisskörper zum Eisenhydroxyd begründet sein, sondern nur die Folge sein einer mehr oder minder ungenauen Neutralisation. Thatsächlich findet man ja nicht selten, trotz möglichst sorgfältiger Ausführung der Neutralisation gegen empfindliches Lackmuspapier, noch recht starke alkalische Reaction, wenn man die betreffende Flüssigkeit auf $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{10}$ ihres ursprünglichen Volumens einengt, und die so zu Tage tretenden Mengen von freiem Alkali sind wohl geeignet, das Gelöstbleiben nicht unbeträchtlicher Albumosenmengen vollauf zu erklären. Um daher das zugesetzte Eisenchlorid sicher zu neutralisiren, ohne jedoch einen Ueberschuss an freiem Alkali zu setzen, versuchte ich unlösliche Carbonate zu verwenden (wie dies schon Landwehr zur quantitativen Abscheidung seines thierischen Gummi's

1) Mathes, Zur Chemie d. leukäm. Blutes. Berlin. Klin. W. 1894, N. 23.

2) Herth, Monatshefte f. Chem. Bd. 5.

gethan hatte, das ja nach Folin¹⁾ im Wesentlichen als Mucinalbumose zu betrachten ist) und gelangte nach einigen nicht ganz zufriedenstellenden Versuchen mit den Carbonaten der alkalischen Erden zum Zinkcarbonat, welches meinen Erwartungen vollkommen entsprach. Ob dieses Salz allerdings lediglich als neutralisirendes Mittel wirkt oder sonst irgendwie an der Fällung der Albumosen betheiligt ist, ist nicht leicht zu entscheiden. Jedenfalls vermag das aus der Umsetzung des Zinkcarbonats mit dem Eisenchlorid hervorgehende Eisencarbonat auch Albumosen niederzuschlagen; aber diese Fällungen sind in verdünnten Säuren und Alkalien sowie in Alkalicarbonaten ebenso löslich wie die Eisenhydroxydniederschläge, so dass also eine vollständige Abscheidung der Albumosen aus ihrer Lösung wieder nur dann zu Stande kommen kann, wenn die Neutralisation eine möglichst genaue ist. Dieser Umstand spricht sehr zu Gunsten einer rein neutralisirenden Wirkung des Zinkcarbonats, da das andere Umsetzungsprodukt desselben mit dem Eisenchlorid, das Chlorzink, noch weniger geeignet erscheint, die Albumosenfällung zu einer vollständigen zu machen, vielmehr nicht einmal die primären Albumosen gänzlich abzuschneiden vermag.

Das Verfahren, wie es sich mir als am praktischsten bewährt hat, ist nun folgendes. Die von den Albumosen zu befreiende Flüssigkeit wird mit ungefähr dem gleichen Volumen 30%iger Eisenchloridlösung und dann so lange mit Lauge versetzt, bis die Reaction nur mehr schwach sauer ist. Das Filtrat von dem entstandenen voluminösen Niederschlag wird mit 1—2 Messerspitzen Zinkcarbonat beschickt und nach tüchtigem Umrühren filtrirt. Die so erhaltene klare und farblose Flüssigkeit war stets albumosenfrei, gab also beim Sättigen mit Ammonsulfat bei allen drei Reactionen keine oder nur eine feinste, auf dunklem Hintergrund eben bemerkbare staubförmige Trübung, wenn es sich um Lösungen von Liebig's Fleischpepton, um Pankreasverdauungen von Rinderserum, um aus Witte'schem Pepton mit

¹⁾ Diese Zeitschr. XXIII. Heft IV u. V.

Hilfe von Eisen- oder Uransalzen gewonnene Albumosenlösungen, endlich um die im Harn erscheinenden Albumosen handelte. Nur da, wo eine Lösung von Witte'schem Pepton vorlag, war es stets nothwendig, das Filtrat noch auf $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{5}$ seines Volumens einzuengen und die Fällung mit einigen Tropfen Eisenchlorid (solange der entstehende Niederschlag zunimmt) und Zinkcarbonat zu wiederholen, um eine völlig albumosenfreie Lösung zu erhalten.

Nachfolgend die Beschreibung einzelner Versuche.

Versuch I.

1 Liter einer 5%igen Lösung von Witte's Pepton in kochsalzhaltigem Wasser wurde erst mit dem gleichen Volumen einer 30%igen Eisenchloridlösung und dann so lange mit Natronlauge versetzt, bis die Reaction schwach sauer war. Das leicht gelblich gefärbte Filtrat wurde mit der genügenden Menge (ca. 10 gr.) Zinkcarbonat tüchtig umgerührt, dann filtrirt und eine kleine Probe der so erhaltenen farblosen Flüssigkeit mit Ammonsulfat in der Siedehitze gesättigt: dieselbe zeigte eine mässige Trübung. Der Rest der Flüssigkeit — 1510 ccm. — wurde am Wasserbad vorsichtig auf 365 ccm. eingeengt, von den in geringer Menge ausgeschiedenen Krystallen abgossen und mehrmals mit Eisenchlorid versetzt, solange die entstehende Trübung zunahm. Das schwach saure Filtrat wurde dann in der geschilderten Weise mit Zinkcarbonat behandelt und nach Entfernung der geringen, in Lösung gegangenen Zinkmenge mit Natriumphosphat, nach Kühne's Vorschrift auf Albumosen geprüft. Die Flüssigkeit blieb beim Sättigen mit Ammonsulfat in der Siedehitze sowohl bei neutraler, wie bei ammoniakalischer und schwach essigsaurer Reaction absolut klar. Bleischwärzender Schwefel war in derselben beim Kochen mit Lauge nicht nachzuweisen, hingegen gab sie starke Biuretreaction.

Versuch II.

30 ccm. einer Albumosenlösung, welche durch Fällung von Witte's Pepton mit Eisenchlorid und Lauge (ohne Zuhilfenahme von Zinkcarbonat), Lösen des Niederschlags in über-

schlüssiger Lauge, Neutralisiren und Abfiltriren von dem geringen durch die Neutralisation entstandenen Niederschlage gewonnen worden war und welche sowohl primäre wie secundäre Albumosen enthielt, wurden mit dem gleichen Volumen 30%iger Eisenchloridlösung und Natronlauge bis zur schwach sauren Reaction versetzt, filtrirt und mit Zinkcarbonat behandelt. Die Prüfung des Filtrates auf Albumosen ergab bei allen drei Reactionen ein absolut negatives Resultat.

Versuch III.

Eine 5%ige Lösung von Liebig's Fleischpepton in physiologischer Kochsalzlösung wurde mit dem gleichen Volumen Eisenchloridlösung und mit Lauge bis zur schwach sauren Reaction versetzt, filtrirt, mit Zinkcarbonat behandelt, vom gelösten Zink befreit und in bekannter Weise auf Albumosen geprüft. Die Flüssigkeit blieb sowohl bei neutraler wie bei stark ammoniakalischer Reaction absolut klar und zeigte bei schwach essigsaurer eine äusserste Spur von staubförmiger Trübung. Biuretreaction war in derselben nicht mehr mit Sicherheit nachzuweisen.

Versuch IV.

30 gr. getrockneten Rinderserums wurden in 600 ccm. einer 0,4%igen Natroncarbonatlösung gelöst und mit 6 gr. käuflichen Pankreatins durch 2 Tage bei 40° C. digerirt. Eine Probe der Flüssigkeit, die bereits reichlich Albumosen enthielt, wurde mit dem gleichen Volumen Eisenchloridlösung der nöthigen Laugemenge, endlich mit Zinkcarbonat behandelt, das Filtrat vom Zink befreit und auf Albumosen geprüft. Bei essigsaurer und ammoniakalischer Reaction in der Siedehitze mit Ammonsulfat gesättigt, blieb die Flüssigkeit absolut klar, während bei neutraler Reaction eine feine staubförmige Trübung auftrat, die nur auf dunklem Hintergrund deutlich wahrzunehmen war.

Die Digestion wurde mit den übrigen 550 ccm. der Flüssigkeit fortgesetzt. Nach weiteren 2 Tagen, also am vierten Tage der Verdauung, ergab die Prüfung auf Albumosen,

nach einmaliger Fällung mit Eisenchlorid, Lauge und Zinkcarbonat

bei neutraler Reaction: feinste staubförmige Trübung,

bei essigsaurer Reaction:

bei ammoniakalischer Reaction: keine Spur von Trübung.

29 ccm. des Filtrates vom Zinkcarbonatniederschlag wurden nun auf 18 ccm. eingengt, mit einigen Tropfen Eisenchlorid und Zinkcarbonat versetzt und abfiltrirt. Die Probe auf Albumosen fiel nun in der von Zink befreiten Flüssigkeit bei allen drei Reactionen absolut negativ aus.

Am sechsten Tage der Verdauung fand sich

bei neutraler Reaction: keine Spur von Trübung,

bei essigsaurer Reaction: feine staubförmige Trübung,

bei ammoniakalischer Reaction: keine Spur von Trübung.

Am achten Tage endlich

bei neutraler Reaction: kaum eine Spur von Trübung,

bei essigsaurer Reaction: feinste staubförmige Trübung,

bei ammoniakalischer Reaction: keine Spur von Trübung.

Versuch V.

Zwei albumosenhaltige Urine, der eine von einer schweren eitrigen Cysto-Pyelitis, der andere von einem Erythema toxicum mit universeller Ausbreitung herrührend, wurden in der angegebenen Weise von den Albumosen befreit. In beiden Fällen gaben die Filtrate keine Spur von Biuretreaction, während die nativen Urine dieselbe sehr intensiv gezeigt hatten.

Alle die angeführten Versuche wurden mehrmals und stets mit dem gleichen Resultate wiederholt.

Bemerkenswerth erscheint die schon erwähnte Thatsache, dass alle untersuchten Albumosenlösungen, mit Ausnahme des Witte-Peptons, schon durch einmalige Fällung mit Eisenhydroxyd-Zinkcarbonat völlig von den Albumosen befreit werden konnten, während die Lösungen von Witte's Pepton dann noch eine mässige Trübung beim Sättigen mit Ammonsulfat gaben, welche auch durch Wiederholung der Fällung bei der-

selben Concentration nicht zum Verschwinden gebracht wurde. Wurde aber die Flüssigkeit eingeengt und dann die Fällung wiederholt, so war dieselbe nunmehr albumosenfrei resp. gab mit Ammonsulfat keine Trübung mehr. Diese Thatsache scheint mir kaum einer anderen Deutung fähig zu sein, als dass es sich hier um eine besondere Art von Albumose von eigenthümlichen Löslichkeitsverhältnissen handelt, welche im Pepton Witte's vorhanden ist, in den übrigen untersuchten Präparaten aber fehlt oder nur in äussersten Spuren sich vorfindet. Leider gelang es mir nicht, diesen Körper in genügender Menge zu erhalten, um ihn auf seine übrigen Eigenschaften hin prüfen zu können.

Zur Entscheidung endlich der Frage, ob Leucin und Tyrosin in beträchtlichem Maasse durch die Eisenhydroxyd-Zinkcarbonatmethode gefällt werden, wurden 1%ige Lösungen dieser Körper in der bekannten Weise behandelt, der entstandene Niederschlag nach der Lassaigne'schen Methode auf Stickstoff untersucht. In beiden Fällen trat nur ein ganz schwach grünlicher Farbenton auf, ein Beweis, dass der Niederschlag nur sehr geringe Mengen von Stickstoff und somit auch von Leucin und Tyrosin enthielt.

Aus den mitgetheilten Versuchen glaube ich mich berechtigt, zu schliessen, dass das beschriebene Verfahren beiden aufgestellten Forderungen zu genügen im Stande ist, nämlich einerseits die Eingangs erwähnten Schwierigkeiten und Unbequemlichkeiten vermeidet und andererseits an Genauigkeit nicht hinter den gebräuchlichen Methoden zurückbleibt.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, dem Vorstande des Instituts, Herrn Dr. E. Freund, für seine Anregung und Unterstützung meinen herzlichsten Dank auszusprechen.