

Ueber die eiweissfällende Wirkung des Chloroforms.

Von

E. Salkowski.

(Aus dem chem. Laboratorium des pathol. Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 3. November 1900.)

Die Mittheilung von Formánek «Ueber die Einwirkung von Chloroform und Chloralhydrat auf den Blutfarbstoff» in Heft 4 und 5, Bd. XXIX dieser Zeitschrift, welche sich nicht allein auf den Blutfarbstoff, sondern auch auf Blut, Blutserum und Eiweiss bezieht, veranlasst mich, auch meinerseits einige einschlägige Beobachtungen mitzutheilen.

Bei meiner vielfachen Beschäftigung mit dem Chloroform in seiner Anwendung als Conservierungsmittel hat mir natürlich die eigenthümliche, unter gewissen Bedingungen auftretende, coagulirende Wirkung des Chloroforms nicht entgehen können.

In meiner Mittheilung über die antiseptische Wirkung des Chloroformwassers aus dem Jahre 1888¹⁾ habe ich bereits erwähnt, dass sich Blut nicht mit Chloroform conserviren lasse, weil es allmählich zu einer dicken Masse geseht. Horbaczewski und Formánek haben diese Angabe augenscheinlich nicht gekannt, woraus ich den genannten Autoren natürlich keinen Vorwurf machen will, um so weniger, als meine Angabe zwar in den Maly'schen Jahresbericht für 1888 übergegangen (S. 355), aber schwer zu finden ist.

Im Interesse anderer Versuche, deren Veröffentlichung ich noch verschiebe, habe ich auch versucht, wie sich mit Chloroform durchgeschütteltes, in Glasstöpselgefässen befind-

1) Deutsche med. Wochenschr., 1888, Nr. 16.

liches Blut bei der Aufbewahrung im Thermostaten bei 40° verhält. Es ergab sich dabei, dass das Blut stets nach längerer oder kürzerer Zeit, etwa 24—48 Stunden, zu einer dicklichen Masse geseht, die meistens ganz compact ist, abgesehen von einer kleinen Quantität blutig gefärbter Flüssigkeit, welche beim Neigen des Glases an der Oberfläche der compacten Masse herabrinnt. Schüttelt man durch und filtrirt an der Saugpumpe, so zeigt sich das Filtrat mitunter nur schwach röthlich gefärbt, meistens aber ziemlich stark blutfarbstoffhaltig, in jedem Fall aber war es stark eiweisshaltig. Es gelang also nicht, das Eiweiss auf diesem Wege zu entfernen. Nach der Publication von Formánek überzeugte ich mich, dass schon kurz dauerndes Erwärmen auf 55° genügt, um das mit Chloroform versetzte Blut in eine solche durch geronnenes Eiweiss dickliche Masse umzuwandeln. Das Filtrat fand ich gleichfalls blutfarbstoffhaltig, indessen will ich damit nicht bezweifeln, dass es unter Umständen gelingen mag, den Blutfarbstoff vollständig zu entfernen. Das — von dem im Thermostaten aufbewahrten Blut — abfiltrirte Eiweiss ist in Wasser und Salzlösungen unlöslich und verhält sich ganz so, wie ein durch Erhitzung von verdünntem Blut erhaltenes Coagulum.

Was die Einwirkung des Chloroforms auf Blutserum betrifft, so möchte ich constatiren, dass genuines Blutserum, welches man behufs Conservirung mit Chloroform durchgeschüttelt hat, auch bei jahrelangem Aufbewahren bei Zimmertemperatur nicht gerinnt und ebensowenig seröse Flüssigkeiten. Damit steht die Angabe von Formánek, dass chloroformhaltiges Blutserum bei alkalischer Reaction bei 50—55° nicht gefällt wird, im Einklang, da unter alkalischer Reaction vermuthlich die genuine alkalische Reaction zu verstehen ist. Indessen bleibt das Chloroform doch nicht ohne Einfluss auf die Eiweisslösung: das mit Chloroform conservirte Blutserum nimmt regelmässig ein eigenthümlich opakes Aussehen an, wenn es auch im durchfallenden Licht durchsichtig bleibt. Noch stärker ist oft die Veränderung des Aussehens conservirter seröser (pathologischer) Flüssigkeiten. In solchen kommt es auch mitunter zur Ausscheidung von ein wenig geronnenem

Eiweiss am Boden der Flasche. Diese Veränderung ist auch Anderen aufgefallen. So erwähnt Hammarsten¹⁾ von einer durch Chloroform conservirten Ascitesflüssigkeit, welche bei der Entleerung gelblich und fast klar war, dass sie nach etwa 2 Monaten dauernder Aufbewahrung ein fast milchweisses Aussehen angenommen hatte.

Friedenthal und Lewandowsky²⁾ haben gefunden, dass Blutserum, auf 55—60° erhitzt, ein eigenthümlich opakes Aussehen zeigt und dass solches Blutserum seine Eigenschaft, auf ein Thier einer andern Species (als die, von welcher das Blutserum stammt) giftig zu wirken, verloren hat. Es wäre von Interesse, zu versuchen, ob das durch Chloroform veränderte Blutserum gleichfalls nicht mehr giftig wirkt.

Die coagulirende Wirkung des Chloroforms auf Eiweiss ist von grossem Interesse: sie steht, ebenso wie die Wirkung auf den Blutfarbstoff, welcher dabei nach Formánek nicht oder jedenfalls nicht wesentlich verändert wird — abgesehen davon, dass er seine Löslichkeit einbüsst — soviel ich sehen kann, ohne Analogie da, wenn man in Erwägung zieht, dass das Chloroform schon in sehr kleinen Mengen wirkt, dass es eine fast ganz indifferente Substanz ist, und dass das aus Blut erhaltene Coagulum sich Lösungsmitteln gegenüber anscheinend ganz ebenso verhält, wie durch Erhitzung entstandenes. Die Möglichkeit, dass durch eine genauere Untersuchung Unterschiede aufgefunden werden könnten, muss allerdings offen gelassen werden.

Bezüglich der Eiweisskörper des Eieralbumens verfüge ich nur über Beobachtungen an mit Wasser (in dem Verhältniss von 1 zu 2 bis 3 Wasser) versetztem, durch Chloroform conservirtem Albumen des Hühnereiweisses. Derartiges verdünntes Albumen gerinnt beim Aufbewahren nicht, wird jedoch stark opak. Mit Chloroformwasser vermischter Eidotter gesteht allmählich zu einem Brei. Das Filtrat der behufs Filtration mit Chloroformwasser verdünnten Masse ist ganz klar — die Filtration erfolgt sehr langsam —; schwach

1) Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 220.

2) Berl. klin. Wochenschr., 1899, Nr. 12.

gelblich gefärbt, von neutraler Reaction und enthält auch nach jahrelangem Stehen etwas Eiweiss, welches beim Erhitzen auscoagulirt. Die auf dem Filter bleibende Masse gibt an Aetheralkohol Fett und Lecithin ab, der mit Aetheralkohol erschöpfte Rückstand erweist sich stark P-haltig. Die betreffende Flasche trug das Datum 23. 11. 1888; die lange Haltbarkeit des Lecithins — wenn man dasselbe nach dem P-Gehalt des Aetherauszugs annehmen kann — und des Vitellins ist jedenfalls bemerkenswerth.

Nicht ohne Interesse erscheint mir, dass auch aus Pepsinverdauung stammende Albumoselösungen, wenn sie mit Chloroform conservirt aufbewahrt werden, unter Umständen gewissermaassen gerinnen. Ich machte diese Beobachtung zufällig gelegentlich meiner Untersuchungen über das Peptotoxin¹⁾ an einer aus käuflichem Serumalbumin erhaltenen Pepton-Lösung. Es handelt sich um den Versuch XLII²⁾ der genannten Abhandlung. Die Albumoselösung war, was ich hier wohl wiederholen darf, folgendermaassen dargestellt.

100 g käufliches Serumalbumin wurden in 2 Liter warmen Wassers gelöst. Die Lösung erfolgte leicht und fast vollständig, jedoch nicht ganz klar. Die Lösung wurde unter sorgfältiger Neutralisirung mit Salzsäure durch Erhitzen auscoagulirt, das Coagulum mit heissem Wasser gut ausgewaschen, abgepresst, mit 3 Liter künstlichem Magensaft 24 Stunden digerirt, dann mit Natriumcarbonat neutralisirt, zum Sieden erhitzt, vom ausgeschiedenen coagulirten Eiweiss abfiltrirt, das Filtrat zuerst auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad zum Syrup eingedampft, dieser mit Alkohol gefällt, die Fällung abfiltrirt, mit Alkohol nachgewaschen und bei gewöhnlicher Temperatur trocknen gelassen. Die Fällung wurde dann in Wasser gelöst, die Lösung³⁾ — das Volumen betrug ca. 200 cem.

1) Virchow's Archiv, Bd. 124, S. 409.

2) Derselbe ist in Folge eines Druckfehlers in der Arbeit als LXII bezeichnet.

3) Vermuthlich ist dieselbe noch einmal filtrirt, doch finde ich hierüber nichts notirt.

— in eine Flasche gegossen, mit Chloroform durchgeschüttelt und gut verschlossen bei Seite gestellt. Nach einiger Zeit (genaue Angaben kann ich nicht machen, da ich die betreffende Flasche erst nach Monaten zufällig wiedersah) hatte sich die Flüssigkeit in einen Brei verwandelt, der sich allmählich in eine compacte Masse und eine darüber stehende gelbliche Flüssigkeit trennte. Eine weitere Untersuchung fand damals nicht statt, die Flasche wurde jedoch für eine spätere gelegentliche Untersuchung aufbewahrt.

Zur Untersuchung wurde zunächst, um die Masse filtrirbar zu machen, etwa das halbe Volumen Chloroformwasser hinzugesetzt, durchgeschüttelt, dann ein Theil des dünnen Breis auf einer Nutsche abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen, das Waschwasser jedoch nicht mit dem Filtrat vereinigt, sondern beseitigt.

In dem beim Filtriren erhaltenen, gut ausgewaschenen Rückstand war Dysalbumose, eventuell auch Globulin zu vermuthen.

Ein Theil des Rückstandes, welcher sich beim Erhitzen mit Wasser zum Sieden nicht merklich löste, wurde 24 Stunden unter vielfachem Schütteln mit 5%iger Kochsalzlösung behandelt, wobei keine merkliche Lösung eintrat, dann filtrirt. Das leicht gelblich gefärbte, neutral reagirende Filtrat blieb beim Erhitzen klar, auch bei Zusatz von Essigsäure; bei nachträglichem Zusatz von ein wenig concentrirter Kochsalzlösung trat indessen eine gleichmässige Trübung ein, welche sich bei nochmaligem Erhitzen zum Sieden nicht änderte. Damit ist die Gegenwart einer kleinen Menge von in Wasser unlöslichem, in 5%iger Kochsalzlösung löslichem Eiweiss nachgewiesen, welches man wohl als Globulin ansehen kann.

Eine grössere Quantität des in Rede stehenden Rückstandes wurde in Wasser suspendirt und etwas Natriumcarbonatlösung hinzugesetzt. Die Substanz quoll zuerst gallertig auf, löste sich dann allmählich innerhalb 24 Stunden vollständig ohne Rückstand. Aus der Lösung fiel bei genauem Neutralisiren mit Essigsäure eine geringe Quantität eines Eiweisskörpers aus, wohl dem Gehalt an Globulin ent-

sprechend,¹⁾ von welchem abfiltrirt wurde. Das Filtrat gab beim Erhitzen zum Sieden nochmals eine geringe Eiweissausscheidung, von welcher abermals abfiltrirt wurde. Das abgekühlte, neutrale Filtrat zeigt folgendes Verhalten zu Reagentien:

1. Zusatz etwa des gleichen Volumens gesättigter Kochsalzlösung: starke Trübung, welche sich beim Erwärmen, von einer geringen, bleibenden Trübung abgesehen, löst, beim Erkalten wieder erscheint.

2. Zusatz von Salpetersäure: Niederschlag, welcher sich im Ueberschuss von Salpetersäure löst; die Lösung wird schnell gelb, auf Zusatz von Natronlauge tief orange.

3. Kupfersulfatlösung: sofort starke Fällung.

4. Essigsäure + Ferrocyankalium: starke Fällung.

Die Reactionen sind die der primären Albumosen, man muss also annehmen, dass die Heteroalbumose beim Stehen der mit Chloroform gesättigten Lösung in Dysalbumose übergegangen ist.

Es ist nun sehr bemerkenswerth, dass die nicht durch Chloroform ausgefällten, in Lösung gebliebenen Albumosen im Allgemeinen den Charakter der secundären Albumosen trugen, das Chloroform also eine Trennung bewirkt hatte.

Das gelblich gefärbte, auf empfindliches Lackmuspapier völlig neutral reagirende Filtrat von der Dysalbumose war völlig frei von in der Hitze coagulirenden Eiweisskörpern (auch bei Zusatz von Essigsäure + Kochsalz); beim Auflösen von Chlornatrium im Ueberschuss, unter Erwärmen zur Beförderung der Lösung, war keine Trübung zu bemerken, man hätte also danach primäre Albumosen ausschliessen können, dennoch war eine kleine Quantität primärer Albumose vorhanden. Als nämlich die mit Salz gesättigte, erkaltete, ganz klare Lösung von dem überschüssigen Kochsalz abgegossen und das Koch-

¹⁾ Nach Neumeister, Lehrbuch der physiol. Chemie. 2. Aufl. S. 231, fällt übrigens auch die Dysalbumose beim Neutralisiren der alkalischen Lösung zum Theil wieder aus: hier fand dies, wenn überhaupt, nur in sehr unbedeutendem Grade statt.

salz in Wasser gelöst wurde, war die Lösung ein wenig trüb und klärte sich beim Erhitzen. Das Chlornatrium hatte also die Albumose mit niedrigerissen. Dem entsprach auch das Verhalten zu Ammonsulfatlösung.

Eine grössere Quantität des Filtrates von der Dysalbumose wurde mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der entstehende Niederschlag abfiltrirt: Fraction I. Das Filtrat wurde mit Ammonsulfat in Substanz völlig gesättigt. Niederschlag: Fraction II.

Beide Fractionen wurden mit halbgesättigter bezw. gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, dann vor der Lösung in Wasser behufs Anstellung der Reactionen schnell oberflächlich mit Wasser abgespült, um die Quantität des anhängenden Ammonsulfats möglichst zu verringern.

Die Lösung aus Fraction I gab ziemlich reichliche Fällung beim Eintragen von Kochsalz (wurde jedoch bei Sättigen damit bei Weitem nicht völlig ausgefällt), ebenso mit Salpetersäure + Kochsalzlösung und mit Essigsäure + Ferrocyankalium. Danach würde dieselbe wenigstens zu einem Theil aus primärer Albumose bestehen: abweichend davon war aber das Verhalten zu Kupfersulfatlösung: bei Zusatz derselben entstand erst sehr allmählich eine geringe Trübung resp. Fällung.

Die Lösung von Fraction II gab keine Fällung beim Eintragen von Kochsalz, auch nicht mit Salpetersäure unter Kochsalzzusatz, blieb mit Kupfersulfat auch bei längerem Stehen völlig klar, dagegen gab sie Fällung mit Essigsäure + Ferrocyankalium. Während alle anderen Reactionen die Fraction II als zu den secundären Albumosen zugehörig charakterisiren, würde sie nach dem Verhalten zu Essigsäure + Ferrocyankalium zu den primären gehören oder wenigstens solche enthalten.

Die Abweichungen in dem Verhalten dieser Albumosen von dem, was für andere Eiweisskörper festgestellt ist, mögen in dem Ausgangsmaterial begründet sein; ich habe diese Frage nicht weiter verfolgt, es genügte mir, festgestellt zu haben, dass das Chloroform eine Trennung der in der Verdauungslösung vorhandenen Albumosen bewirkt hat, insofern, als die

ausgefällte Albumose zweifellos primäre war, und zwar Dysalbumose, die in Lösung gebliebenen anscheinend ein Gemisch von Protalbumose mit Deuteroalbumosen, unter starkem Ueberwiegen der letzteren.

Endlich sei noch erwähnt, dass aus mit Chloroform conservirter Milch sich beim Stehen das Casein allmählich vollständig ausscheidet, indem es zugleich das Fett vollständig mitreisst. Die über dem Casein stehende, gelbliche, neutral reagirende Flüssigkeit ist völlig frei von Casein, enthält dagegen unverändertes Lactalbumin, welches beim Erhitzen auscoagulirt.

Es scheint mir sehr bemerkenswerth, dass die beiden untersuchten Milchproben, trotzdem sie 13 Jahre lang aufbewahrt waren — eine kleine Probe trug das Datum 1. Juli 1887, eine grössere von 3 Liter Milch mit 9 ccm. Chloroform das Datum 1. August 1887 — sich, abgesehen von einer gelblichen Färbung des Milchserums, ganz unzersetzt erwiesen. Sie zeigten nach dem Austreiben des Chloroforms beim Erhitzen den normalen Milchgeruch und enthielten keine Albumosen oder Pepton, wenigstens nicht sicher nachweisbar. Die Filtrate von dem auscoagulirten Albumin gaben allerdings Trübung mit Essigsäure, Ferrocyankalium und schwache Biuretreaction, letztere sowohl direkt, als nach der vorgängigen Ausfällung mit Phosphorwolframsäure, allein das findet man sehr häufig auch bei künftlicher Milch; diese zweifelhaften Spuren sind also bedeutungslos.¹⁾ Ausserdem gelang es übrigens nicht, durch Ammonsulfat Albumosen auszufällen: es entstanden zwar sehr geringe, harzige Fällungen, sie waren aber in heissem Wasser nur zum kleinsten Theil löslich, und diese Lösung gab keine Biuretreaction. Auch das Filtrat von dieser Fällung gab keine Biuretreaction, wie das eigentlich nach dem Befund bei der direkten Anstellung der Biuretreaction hätte der Fall sein müssen.

Daraus folgt, dass die Milch kein bei neutraler Reaction wirkendes proteolytisches Ferment enthält, andererseits aber

¹⁾ Vgl. hierüber Feinberg, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 33, Heft 5-6 1897, S. 16 des S-A.

auch, und das scheint mir von grösserer Bedeutung, dass Albumin bei noch so langer Aufbewahrung seiner Lösung keine spontane Zersetzung unter Bildung von Albumosen und Peptonen erleidet. Das gilt allerdings zunächst nur von Lactalbuminlösungen, darf aber wohl verallgemeinert werden. Wo sich also derartige Veränderungen bei gewöhnlicher Temperatur zeigen, hat man stets Grund, ein Enzym anzunehmen.

Ob die Caseinabscheidung etwa auf einem geringen Gehalt der Milch an Labferment beruht, bleibt noch zu untersuchen, direkt schliessen kann man es aus dem Befund nicht, denn auch aus käuflicher sterilisirter Milch scheidet sich bei längerer Aufbewahrung Casein ab.