

# Über die Fällung des Serumglobulins im Blutserum mittels Essigsäure.

Von

**W. Huiskamp.**

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. November 1905.)

Von Hammarsten<sup>1)</sup> wurde gefunden, daß in einer möglichst salzfreien, neutralen Lösung von Serumglobulin durch Zusatz von geringen Mengen Salz, z. B. Kochsalz bis zu einem Gehalt von 0,1—0,3%, eine Fällung hervorgerufen wird. Hammarsten zeigte dann weiter, daß diese Fällung durch einen geringen Überschuß von Salz, sowie auch durch ein wenig Alkali wieder gelöst wird. Es läßt sich die Erscheinung der Fällung des Serumglobulins durch geringe Salzmengen auch am Blutserum<sup>2)</sup> selbst beobachten, falls man dasselbe z. B. mit dem zweifachen Volumen Wasser verdünnt und dadurch den Salzgehalt auf etwa 0,3% bringt; wegen des Alkaligehalts der Flüssigkeit entsteht dann noch kein Niederschlag; neutralisiert man das Alkali oder wird die alkalische Reaktion abgestumpft, so fällt Serumglobulin aus. Daß dieser Niederschlag tatsächlich durch den Gehalt von etwa 0,3% Salz verursacht wird, geht daraus hervor, daß, falls der Niederschlag abzentrifugiert und mit Wasser gemischt wird, das Wasser den Niederschlag löst und zwar desto besser, je vollständiger durch das Zentrifugieren die Flüssigkeit und damit die darin enthaltenen Salze aus dem Niederschlage entfernt waren. Die Auflösung in Wasser von Zimmertemperatur erfordert einige Zeit; erwärmt man das Gemisch auf 40°, so tritt die Lösung sehr schnell

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv, Bd. XVIII, S. 38.

<sup>2)</sup> Mit Blutserum wird, falls nicht ausdrücklich anders bemerkt, hier Rinderserum gemeint.

ein. In der auf diese Weise erhaltenen Lösung in Wasser kann durch Zusatz von NaCl bis zu einem Gehalt von 0,1—0,3% wieder ein Niederschlag hervorgerufen werden. Der aus dem Serum erhaltene Niederschlag ist also löslich in Wasser, nicht aber in 0,1—0,3%iger Salzlösung. Ich habe schon früher<sup>1)</sup> den Versuch gemacht, eine Erklärung für die Wirkung der geringen Salzmengen in derartigen Fällen zu geben, worauf ich der Kürze halber hier verweisen möchte.

Von dieser durch geringe Salzmengen verursachten Fällung läßt sich der Niederschlag, welcher durch Ansäuern mit Essigsäure in mit dem zweifachen Volumen Wasser verdünntem Blutserum hervorgerufen werden kann, leicht unterscheiden und trennen. Es ist dies eine Tatsache, welche, wie mir scheint, in der Literatur wenig beachtet worden ist. Filtriert man nämlich die durch Neutralisation<sup>2)</sup> erhaltene Fällung ab, so verursacht Zusatz von Essigsäure im Filtrate zunächst keinen neuen Niederschlag; fährt man aber mit dem Zusatz fort, so entsteht schließlich wieder ein Niederschlag. Als Beispiel führe ich folgenden Versuch an. Ein Liter Serum wurde mit zwei Liter Wasser verdünnt; nach dem Zusatz von 20 ccm 6%iger Essigsäure war die Reaktion gegen Lackmus schwach sauer geworden; der gebildete Niederschlag wurde abzentrifugiert; der ganz klar zentrifugierten Flüssigkeit konnten 15 ccm 6%ige Essigsäure zugesetzt werden, bevor eine neue bleibende Trübung entstand; nachdem darauf noch 14 ccm derselben Essigsäurelösung zugesetzt waren, hatte sich ein großer flockiger Niederschlag gebildet.

Es lassen sich demnach deutlich zwei Niederschläge unterscheiden; den ersten, welcher bei einem Salzgehalt von etwa 0,3% ausfällt, werde ich in der Folge als «Salzglobulin», den zweiten als «Essigsäureglobulin» bezeichnen.

Es schien mir nicht ohne Interesse, zu untersuchen, ob vielleicht diese beiden Körper in ihrem qualitativen Verhalten oder in der quantitativen Zusammensetzung Unterschiede auf-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 51.

<sup>2)</sup> Um sicher zu sein, daß alles Alkali neutralisiert worden ist, empfiehlt es sich, in diesem Falle die Flüssigkeit ganz schwach anzusäuern.

weisen. Hinsichtlich der Ausbeute an beiden Substanzen ist zu bemerken, daß vom Salzglobulin regelmäßig etwas mehr erhalten wurde als vom Essigsäureglobulin.

Zur weiteren Untersuchung wurden die beiden Niederschläge einige Male mit Wasser, welchem eine geringe Menge Essigsäure zugesetzt war, und darauf mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Präparate, welche für die Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung dienten, wurden sodann mit Alkohol und mit Äther mehrmals tagelang extrahiert, schließlich mit absolutem Alkohol ausgewaschen und im Exsikkator getrocknet. Für die qualitative Untersuchung wurden die Niederschläge in Wasser mit Hilfe von möglichst wenig Ammoniak gelöst; eine alkalische Reaktion war für die Lösung nicht erforderlich.

#### Verhalten der Lösungen gegen geringe Salzmengen.

Sowohl das Essigsäureglobulin als das Salzglobulin wird durch Zusatz von  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  bis zu einem Gehalt von 0,1—0,3% teilweise gefällt. Die Niederschläge lösen sich im Überschuß oder auch durch Zusatz von ein wenig Alkali. Es fragt sich also, warum das Essigsäureglobulin nicht sofort zusammen mit dem Salzglobulin im Serum gefällt worden ist. Hierzu ist zu bemerken, daß die Fällung in beiden Fällen unvollständig ist, und es läßt sich daher schon jetzt vermuten, daß das Essigsäureglobulin nur ein bei der Fällung des Salzglobulins in Lösung gebliebener Anteil dieses Körpers ist, welcher dann später durch die Essigsäure gefällt wird.

#### Verhalten gegen Essigsäure.

Die Lösungen beider Körper werden durch Essigsäure gefällt; die Niederschläge lösen sich im Überschuß. Das Essigsäureglobulin löst sich schwieriger im Überschuß als das Salzglobulin.

#### Verhalten gegen Ammonsulfat.

Beim Zusatz von Ammonsulfat bis zu 34% der Sättigung fällt aus beiden Lösungen der größte Teil des Eiweißes aus.

Beide Körper enthalten demnach viel «Euglobulin» und wenig «Pseudoglobulin»; dieser Befund steht mit den Beobachtungen von Joachim und Freund<sup>1)</sup> über das mit Essigsäure gefällte Serumglobulin in Einklang.

Die Koagulationstemperatur lag für beide Lösungen (in 3½% NaCl) bei 74—75°.

Versuche mit Pferdeserum ergaben ähnliche Resultate, als hier für das Rinderserum beschrieben sind. Hinsichtlich der bei der Fällung des Pferdeserums benötigten Mengen Essigsäure führe ich folgenden Versuch an. Es wurden 333 ccm Serum mit Wasser zu einem Liter verdünnt; nachdem 6 ccm 6%ige Essigsäure zugesetzt waren, war die Reaktion sehr schwach sauer geworden; der entstandene Niederschlag war nicht so groß als unter sonst gleichen Umständen beim Rinderserum. Der Niederschlag wurde abfiltriert. Dem Filtrate konnten 10 ccm 6%ige Essigsäure zugesetzt werden, bevor wieder eine neue bleibende Trübung entstand.

#### Quantitative Zusammensetzung der aus Rinderserum erhaltenen Körper.

Die für die Analysen benutzten Substanzmengen wurden bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Salzglobulin. 0,2878 g Substanz lieferten 0,5546 g CO<sub>2</sub> und 0,1975 g H<sub>2</sub>O.

0,4180 g Substanz lieferten (bei der N-Bestimmung nach Kjeldahl) 0,079475 g NH<sub>3</sub>.

0,5332 g Substanz lieferten nach Verbrennung mit Salpeter und Soda über der Weingeistflamme 0,0418 g BaSO<sub>4</sub>.

0,5352 g Substanz lieferten 0,0027 g Asche; der Aschengehalt betrug demnach 0,504%.

Auf aschenfreie Substanz berechnet wurden also gefunden:

C = 52,83%, H = 7,66%, N = 15,73%, S = 1,079%.

Essigsäureglobulin. 0,2968 g Substanz lieferten 0,5703 g CO<sub>2</sub> und 0,1986 g H<sub>2</sub>O.

0,2647 g Substanz lieferten (bei der N-Bestimmung nach Kjeldahl) 0,050788 g NH<sub>3</sub>.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 407.

0,5312 g Substanz lieferten 0,0408 g BaSO<sub>4</sub>. 0,4502 g Substanz lieferten 0,0020 g Asche; der Aschengehalt betrug also 0,444<sup>o</sup>/<sub>o</sub>.

Auf aschenfreie Substanz berechnet, wurden demnach gefunden:

$$C = 52,64\%, H = 7,46\%, N = 15,87\%, S = 1,060\%.$$

Von Phosphor wurden in den beiden Körpern nur Spuren gefunden. Aus 0,8407 g Essigsäureglobulin wurden 0,002 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> erhalten, während 0,7178 g Salzglobulin keine wägbare Menge Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> lieferten. In Anbetracht dessen, daß die für die Analysen benutzten Präparate mit essigsäurehaltigem Wasser, Alkohol und Äther ausgezogen waren, wodurch Phosphate und Lecithin entfernt wurden, ist es wahrscheinlich, daß die im Essigsäureglobulin gefundene Spur von Phosphor von einer allerdings sehr geringen Verunreinigung dieser Substanz mit einem phosphorhaltigen Eiweißkörper herrührt. Joachim und Freund<sup>1)</sup> haben im Serum in sehr geringen Mengen einen phosphorhaltigen Eiweißkörper, welcher bei der Verdauung Nuclein oder Pseudonuclein lieferte; gefunden. In etwas größeren Mengen konnte Pekelharing<sup>2)</sup> aus Plasma ein Nucleoprotein darstellen und zwar namentlich aus demjenigen Teil der Plasma-eiweißkörper, welcher beim Zusatz von überschüssiger Essigsäure am längsten ungelöst blieb.

Die für die Zusammensetzung des Salzglobulins und des Essigsäureglobulins gefundenen Zahlen stimmen unter einander und mit den von andern Forschern für das Serumglobulin gefundenen Zahlen gut überein. Der einzige Unterschied, welcher zwischen den beiden Körpern gefunden wurde, ist dieser, daß das Essigsäureglobulin sich in überschüssiger Essigsäure schwieriger löst als das Salzglobulin; doch glaube ich diesem Unterschied keine große Bedeutung beilegen zu müssen, zumal weil bei der Fällung aus dem Serum das Essigsäureglobulin mit etwas stärkeren Essigsäurelösungen in Berührung gekommen ist und dadurch die Löslichkeitsverhältnisse dieses Körpers sich etwas geändert haben können. Das Essigsäureglobulin möchte ich

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> Untersuchungen über das Fibrinferment. Amsterdam 1892.

daher als einen bei der Neutralisation des Serums in Lösung gebliebenen Teil des Salzglobulins betrachten.

Daß das Serumglobulin eine Säure darstellt, welche Basen zu binden imstande ist, wurde schon vor Jahren von Hammarsten<sup>1)</sup> hervorgehoben. Die Menge der Basen, welche das Serumglobulin zu binden vermag, läßt sich bequem im mittels  $\text{CaCl}_2$  bereiteten Calciumsalze des Serumglobulins bestimmen, weil ein etwaiger Überschuß von  $\text{CaCl}_2$  leicht durch Auswaschen mit Alkohol entfernt werden kann, ohne das Calciumsalz des Serumglobulins selbst zu lösen. Zur Bestimmung des gebundenen Calciums habe ich die Ca-Verbindungen des Salzglobulins und des Essigsäureglobulins auf folgende Weise bereitet. Die beiden Körper wurden auf die schon oben beschriebene Weise aus dem Serum gefällt; die Niederschläge wurden mit essigsäurehaltigem Wasser, darauf mit destilliertem Wasser ausgewaschen und sodann unter Zusatz von  $\text{NH}_3$  in Wasser gelöst. Um sicher zu sein, daß alle Säuregruppen des Globulins durch Ammoniak gesättigt waren, wurde  $\text{NH}_3$  bis zu sehr schwach alkalischer Reaktion zugesetzt. Diesen Lösungen wurde soviel  $\text{CaCl}_2$  zugesetzt, daß der Gehalt daran 0,2% betrug. Es fällt dann die Calciumverbindung des Globulins aus. Diese Niederschläge wurden mit Alkohol tagelang extrahiert, bis alles überschüssige  $\text{CaCl}_2$  entfernt war; darauf wurden die Präparate mit Äther extrahiert und getrocknet. Zur Bestimmung des Calciumgehaltes wurden die Substanzen verascht und in der Asche nach den üblichen Regeln die Menge des Calciums bestimmt.

Salzglobulin. Präp. I.: 1,3850 g Substanz lieferten 0,0101 g CaO;  
Ca-Gehalt = 0,521%

Präp. II: 0,4205 g Substanz lieferten 0,0032 g CaO; Ca-Gehalt  
= 0,544%.

Präp. III: 1,4496 g Substanz lieferten 0,0119 g CaO; Ca-Gehalt  
= 0,586%.

Essigsäureglobulin. Präp. I: 0,9919 g Substanz lieferten  
0,0081 g CaO; Ca-Gehalt = 0,583%.

Präp. II: 0,3446 g Substanz lieferten 0,0031 g CaO; Ca-Gehalt  
= 0,643%.

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv, Bd. XVII, S. 413.

Präp. III: 1,1624 g Substanz lieferten 0,0109 g CaO; Ca-Gehalt  
= 0,670%.

Für das Salzglobulin wurde also im Mittel 0,550% Ca gefunden, für das Essigsäureglobulin im Mittel 0,632%. Das Mittel für das Essigsäureglobulin ist demnach ein wenig höher, doch ist der Unterschied nicht sehr bedeutend und hängt vielleicht mit der für die beiden Substanzen verschiedenen Art der Darstellung aus dem Serum zusammen.

---