

Eine Farbenreaktion von Eiweißkörpern mit Nitroprussidnatrium.

Von
Vinzenz Arnold.

(Aus der Abteilung für Infektionskrankheiten des allgemeinen Krankenhauses zu Lemberg.)

(Vorgelegt der Akademie der Wissenschaften in Krakau am 21. Febr. 1910.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. Dezember 1910.)

Eine Reihe von Eiweißkörpern gibt mit Nitroprussidnatrium und Ammoniak eine charakteristische Farbenreaktion. Diese Reaktion wird in folgender Weise vorgenommen: Wenn es sich um einen in Wasser gelösten Eiweißkörper handelt, versetzt man 1—2 ccm der Lösung mit einigen (2—4) Tropfen einer 4—5%igen Nitroprussidnatriumlösung und darauf mit einigen Tropfen Ammoniak, worauf die Lösung sofort eine intensive purpurrote Färbung annimmt. Auf Zusatz von Essigsäure entfärbt sich die Lösung sofort. Die Farbenreaktion ist nicht flüchtig, die purpurrote Färbung verblaßt allmählich etwa im Verlauf einer Viertelstunde. Das Ammoniak läßt sich bei dieser Reaktion durch stark verdünnte Kali- oder Natronlauge ersetzen, doch ist NH_3 vorzuziehen.

Zur Vornahme dieser Reaktion eignet sich vortrefflich das Gemenge der peptischen Abbauprodukte von Eiereiweiß oder der Stromasubstanz des Fleisches. Es genügt zu diesem Zwecke, rohes Eiereiweiß nach Verdünnung mit 1—2 Volumen Wasser durch eine Stunde bei 37° mit Pepsin-HCl der Verdauung zu überlassen, um eine mit Nitroprussidnatrium stark reagierende Lösung zu erhalten.

Eine sehr kräftige und schöne Reaktion zeigen auch die wasserlöslichen Eiweißkörper der Krystallinse des Auges.

Ebenso schön läßt sich diese Reaktion auch an ausgefällten Eiweißstoffen zeigen. Man kann dazu die vermittelst Na_2SO_4 oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällten Eiweißkörper der Krystall-

linse benützen. Man breitet etwas von dem ausgefällten und ausgewaschenen Eiweißniederschlage auf Filtrierpapier aus, benetzt die Eiweißschicht mit einigen Tropfen der 4%igen Nitroprussidnatriumlösung, entfernt nach einigen Augenblicken das überschüssige Reagens mittels eines untergelegten Streifens Filtrierpapier und bringt dann mit Hilfe eines Glasstabes einen Tropfen NH_3 auf den Niederschlag, welcher nun sogleich eine purpurrote Färbung annimmt. Diese Färbung tritt übrigens schon ein, wenn man den in NH_3 eingetauchten Glasstab nur in die Nähe der mit dem Reagens benetzten Eiweißschicht bringt. Man kann zur Vornahme dieser Reaktion auch durch Kochen ausgefälltes und gut ausgewaschenes Eiereiweiß oder Ovalbumin benützen, welches jedoch diese Reaktion in etwas schwächerem Grade zeigt.

Da übrigens in allen Organen Gewebeeiweißstoffe vorkommen, die diese Reaktion in mehr oder weniger intensivem Grade zeigen, so genügt es, ein Stückchen irgend eines Gewebes auf Filtrierpapier mittels eines Spatels auszubreiten und dann die Reaktion vorzunehmen. Die kräftigste und schönste Reaktion zeigt unter allen Organen des Tierkörpers die Krystalllinse. Es ist jedoch diese Reaktion der Organe des Tierkörpers nicht ausschließlich auf Eiweißkörper zu beziehen.

Es läßt sich unschwer zeigen, daß diese Reaktion eine Eigenschaft der betreffenden Eiweißkörper ist. Man verreibt zu diesem Zwecke zwei ganz frische Krystallinsen mit etwas Wasser und erhält auf diese Weise eine etwas viscide, opalisierende, schwach alkalische Lösung, die nach geeigneter Verdünnung auch ohne Schwierigkeit filtriert werden kann. Ein wasserunlöslicher Anteil der Linse war dabei nicht zu beobachten. Eine solche Lösung wurde nach Ansäuerung mittelst $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt, der Niederschlag gewaschen, wieder gelöst und gefällt und dies noch einmal wiederholt. Wird das auf diese Weise gereinigte Präparat nun wieder in Wasser gelöst und mittelst $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt oder durch Kochen koaguliert, so erhält man ein Filtrat, welches keine Spur einer Nitroprussidreaktion mehr zeigt, und eine Eiweißfällung, die in charakteristischer Weise reagiert. Das durch Kochen ausge-

fällte Eiereiweiß kann oftmals mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen werden, ohne daß sein Verhalten gegen Nitroprussidnatrium eine Änderung erfahren würde.

* Zur Ausfällung der mit Nitroprussidnatrium reagierenden Eiweißkörper ist eine indifferente Methode zu wählen; es eignet sich dazu vor allem die Ausfällung vermittelt der Neutralsalze (Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und MgSO_4); auch die mit Alkohol und Phosphorwolframsäure erzeugten Fällungen zeigen die Reaktion, während die durch Eisenchlorid, Sublimat und Kaliumquecksilberjodid erhaltenen Eiweißniederschläge sie nicht mehr geben. Durch Jod, Brom oder H_2O_2 in alkalischer Lösung wird diese Reaktion ebenfalls sogleich vernichtet. In alkalischer Lösung verlieren die mit Nitroprussidnatrium reagierenden Eiweißkörper diese Reaktion in kurzer Zeit, während in einer sauer reagierenden Lösung (z. B. der peptischen Abbauprodukte von Eiereiweiß) die Reaktion nur allmählich abnimmt und erst nach Wochen vollständig verschwindet. Am besten lassen sich diese Eiweißkörper in trockenem Zustande aufbewahren; auf Filtrierpapier in dünner Schicht eingetrocknete Krystallinsensubstanz zeigte noch nach Jahresfrist die Farbenreaktion fast ebenso stark, wie in frischem Zustande. Ebenso lange konnte auch ohne Änderung des ursprünglichen Verhaltens mit Na_2SO_4 ausgefälltes Organeiweiß der Thymusdrüse und anderer Organe in trockenem Zustand aufbewahrt werden. Durch Hitze koagulierte Eiweißkörper (z. B. gekochtes Fleisch) zeigen die Reaktion noch ebenso schön wie vorher.

Von den Eiweißstoffen des Muskels geben die Muskelglobuline (Myosin und Muskulin) die Reaktion mit Nitroprussidnatrium durchaus deutlich, aber nicht kräftig. (Die Darstellung derselben wurde nach der Vorschrift Halliburtons vorgenommen.) Eine sehr schöne und kräftige purpurviolette Reaktion gibt die Stromasubstanz des Muskels, welche nach vollständiger Entfernung sämtlicher in Wasser und verdünnter Salzlösung löslicher Eiweißkörper neben etwas Bindegewebe als unlösliche, rein weiße, flockige Masse zurückbleibt. (Nach v. Fürth entsteht bekanntlich die Stromasubstanz durch einen Gerinnungsprozeß hauptsächlich aus dem Myogen des frischen

Muskels. Das Verhalten dieses Eiweißkörpers habe ich jedoch bisher nicht untersucht.) Die Stromasubstanz wird durch verdünnte Salzsäure sogleich in eine gallertige Masse von Acidalbumin umgewandelt. Dieses gibt, wie die Stromasubstanz, eine schöne Reaktion mit Nitroprussidnatrium, auch wenn es einigemal ausgefällt und wieder gelöst wurde. Zur Vornahme der Reaktion eignet sich am besten ausgefalltes Acidalbumin. Dazu kann der Niederschlag verwendet werden, den Nitroprussidnatrium in einer sauer reagierenden Acidalbuminlösung erzeugt.

Nitroprussidnatrium fällt in 4—5%iger Lösung alle Eiweißstoffe aus saurer Lösung (G. Mya und R. Palm); gefällt werden außerdem auch die Albuminate aus saurer Lösung. Nicht gefällt wird Ovomuroid. Auch die primären Albumosen (aus Wittes Pepton) werden, wenn auch unvollständig, gefällt, doch bildet sich ein bleibender Niederschlag erst nach Zusatz von überschüssigem Reagens. Dieser Niederschlag löst sich bei gelindem Erwärmen. Die Deuteroalbumosen werden nicht mehr gefällt. Auch in einer Glutinlösung bildet sich ein bleibender Niederschlag erst nach Zusatz einer größeren Tropfenzahl der Nitroprussidnatriumlösung. Diese Eiweißniederschläge kann man — soweit es sich um einen Eiweißkörper handelt, welcher die Farbenreaktion mit Nitroprussidnatrium zeigt — zur Anstellung dieser Farbenreaktion benützen.

Das Gemenge der aus Stromasubstanz durch Pepsin-salzsäure entstehenden Verdauungsprodukte reagiert mit Nitroprussidnatrium mit intensiver purpurvioletter Farbe. Dieses Verdauungsgemisch wurde neutralisiert, das klare Filtrat, welches kein koagulables Eiweiß enthielt, nach Ansäuerung mittels verdünnter H_2SO_4 mit $(NH_4)_2SO_4$ oder Na_2SO_4 gesättigt. Der reichliche Albumosenniederschlag wurde mit konzentrierter Salzlösung gewaschen, wieder gelöst und ausgefällt. Dieser Niederschlag gibt eine schöne purpurrote Reaktion mit Nitroprussidnatrium. Das wasserklare Filtrat gibt mit Nitroprussidnatrium noch eine ziemlich starke Reaktion. Es gibt außerdem eine rosarote Biuretreaktion. Fällt man jetzt mit Phosphorwolframsäure, so gibt der erhaltene Niederschlag nach

dem Auswaschen noch eine deutliche positive Reaktion mit Nitroprussidnatrium. Wird ein solches Filtrat nach Ausfällung der Albumosen mittelst $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und nach entsprechender Verdünnung mit einer Lösung von Wittes Pepton (welches diese Farbenreaktion nicht gibt) vermischt und dann wieder mit dem Salz gesättigt, so zeigen die ausfallenden Albumosen die Reaktion nicht.

Ganz ähnlich verhält sich auch das Eiereiweiß des Hühneries. Das flüssige Eiweiß gibt keine Reaktion mit Nitroprussidnatrium; wird es aber mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, dann mit Pepsin und Salzsäure versetzt und bei 37° der Verdauung überlassen, so bemerkt man nun eine rasch an Intensität zunehmende positive Farbenreaktion mit Nitroprussidnatrium. Bereits nach einer Stunde ist das Maximum der Reaktion erreicht. Man kann sich jetzt überzeugen, daß die Reaktion hauptsächlich durch Acidalbuminat und Albumosen verursacht wird; doch gibt auch das Filtrat nach Ausfällung derselben durch Na_2SO_4 noch eine deutliche Reaktion; dieses Filtrat zeigt auch eine deutliche Biuretreaktion. Der mit Phosphorwolframsäure erhaltene Niederschlag zeigt auch noch eine deutliche Farbenreaktion mit Nitroprussidnatrium. Das gleiche Verhalten zeigt auch durch Hitze koaguliertes und gut ausgewaschenes Eiereiweiß, nur daß der Verdauungsprozeß längere Zeit in Anspruch nimmt. Die mitgeteilten Versuche führen jedenfalls zu dem Ergebnis, daß auch peptische Abbauprodukte von Eiweißkörpern, welche mit Nitroprussidnatrium reagieren (Albumosen, Peptone), diese Farbenreaktion in charakteristischer Weise zeigen.

Wird ein aus einem Organ (Leber, Thymus) erhaltener Organbrei nach Ansäuerung mit Na_2SO_4 bei $34\text{--}35^\circ$ verrieben, wodurch die Gewebseiweißkörper ausgefällt werden, die krümlige Masse dann oftmals mit gesättigter Natriumsulfatlösung verrieben und ausgepreßt und darauf noch mit Alkohol und Äther behandelt, so zeigt die erhaltene, meist vollständig farblose Substanz — die aus den ausgefällten Gewebseiweißkörpern neben etwas Bindegewebe besteht — diese Farbenreaktion in starkem Grade. Alle Organe zeigen in dieser Beziehung das

gleiche Verhalten. Das eigentliche Bindegewebe (Sehnen, Fascien, Knorpel) zeigt diese Reaktion nicht. Im Knorpel treten bloß die Zellen als gefärbte Punkte hervor. Das Glutin gibt diese Reaktion nicht. Bezüglich des Glaskörpers wäre zu erwähnen, daß das Mucoid desselben diese Farbenreaktion nur in sehr schwachem Grade zeigt.

Etwas anders als die Eiweißkörper der tierischen Organe verhalten sich einige Eiweißkörper des Hühnereies, welche diese Reaktion zwar nicht im nativen, wohl aber in denaturiertem Zustand zeigen. Zu dieser Gruppe gehören von den Eiweißkörpern des Eiklars das Ovoglobulin und Ovalbumin, während das Ovomuroid diese Reaktion nicht zeigt. Sowohl das Globulin, als auch das Albumin des Eiklars zeigen nach der Ausfällung durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, also in nativem und wasserlöslichem Zustand keine Spur einer Reaktion mit Nitroprussidnatrium. Werden sie aber durch Aufkochen ihrer Lösung, durch Ausfällung mittels Salzsäure, Alkohol oder Nitroprussidnatrium zugleich denaturiert, so zeigen sie nun diese Farbenreaktion. Ebenso verhält sich das Ovovitellin. Durch Alkohol ausgefällt (und zugleich denaturiert) und mit Äther gereinigt, zeigt das rein weiße Präparat eine schöne, doch erheblich schwächere Reaktion als das denaturierte Ovalbumin. In nicht denaturiertem Zustande (d. i. durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt) zeigt es die Reaktion nicht.

Mit Nitroprussidnatrium reagierende Eiweißkörper wurden in allen untersuchten Tierarten gefunden. Ihr Vorkommen beschränkt sich aber nicht auf die tierischen Organismen. Sie werden auch in der Pflanze angetroffen. Mit Leichtigkeit können sie oft im Samen nachgewiesen werden (Bohne, Linse, Äpfel- und Orangenkerne). Die Reaktion ist hier jedoch immer relativ schwach und nicht mit der kräftigen Reaktion tierischer Organeiweißkörper zu vergleichen. Auch der Steinpilz (besonders das Gewebe des Stengels) zeigt diese Reaktion. In grünen Pflanzenteilen wird sie jedoch immer vermißt.

An die Eiweißkörper des Hühnereies lassen sich die Keratine anschließen, die in unverändertem Zustand diese Reaktion natürlich nicht zeigen, aber durch Einwirkung von Kali-

oder Natronlauge in Albuminate, Albumosen und Peptone übergeführt werden, die diese Reaktion in sehr kräftiger Weise geben. Untersucht wurde das Keratin der Nägel, der Haare, der Vogelfedern und der Eihaut des Hühnereies. Die erhaltenen Albuminat- und Albumosenniederschläge wurden ausgewaschen und in dünner Schicht auf Filtrierpapier trocken aufbewahrt; noch nach Wochen zeigten sie eine starke und schöne Reaktion.

Die letzte Gruppe bilden endlich die Eiweißkörper, welche eine Farbenreaktion mit Nitroprussidnatrium nicht geben. Es gehören hierher außer dem Ovomuroid des Hühnereies noch die Eiweißkörper des Blutserums und der Exkrete und Sekrete des Organismus (Mucin des Mundspeichels, das Casein der Milch, die Harneiweißkörper).

An abgespaltenes Alkalisulfid kann bei dieser Reaktion nicht gedacht werden. In keiner der Lösungen (untersucht wurden peptische Verdauungslösungen aus Stromaeiweiß, Eiereiweiß usw.) konnte SH_2 nachgewiesen werden. Durch Einwirkung von Ammoniak bei Zimmertemperatur kommt es auch zu keiner Alkalisulfidabspaltung. Wird jedoch eine solche Lösung vorher mit Natronlauge gekocht, so kann SH_2 mit Leichtigkeit nachgewiesen werden. Es verläuft übrigens die Farbenreaktion einer Alkalisulfidlösung mit Nitroprussidnatrium und Ammoniak in anderer Weise als die hier beschriebene Reaktion der Eiweißkörper. Die violette Färbung geht rasch in Blauviolett und Dunkelblau über, während der purpurrote Farbenton der Reaktion eines Eiweißkörpers sich nicht ändert und nur allmählich verblaßt.

Von den das Eiweißmolekül zusammensetzenden Aminosäuren zeigt nur das Cystein dieselbe Reaktion (untersucht wurden folgende Aminosäuren: Glykokoll, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Cystin, Histidin, Tryptophan und Taurin). Es zeigen auch tatsächlich die mit Nitroprussidnatrium reagierenden Eiweißkörper ein gleiches Verhalten wie diese Aminosäure. Das Cystein ist bekanntlich nur in trockenem Zustand und in saurer Lösung beständig, während es in alkalischer Lösung rasch zu Cystin oxydiert wird. Es ist empfindlich gegen die Einwirkung oxydierender Agenzien

(Jod, Brom, H_2O_2 , Metalloxyde wie $FeCl_3$). Das gleiche gilt aber auch für die diese Reaktion zeigenden Eiweißkörper. Es kann daher wohl mit Recht angenommen werden, daß die reagierende Gruppe, welche diese Farbenreaktion der Eiweißkörper verursacht, das Cystein ist, und daß die wechselnde Intensität dieser Reaktion von der Anzahl reaktionsfähiger Cysteingruppen abhängt.

Bereits nach Beendigung der vorliegenden Arbeit habe ich einige Arbeiten A. Heffters kennen gelernt, welche sich auf den Gegenstand derselben beziehen.¹⁾ Heffter kennt bereits die hier mitgeteilte Farbenreaktion hinsichtlich des Ovalbumins. Dieses gibt nach Heffter eine positive Reaktion, während Serumeiweiß, Fibrin, Eierglobulin, Wittepepton diese Reaktion nicht zeigen. Frische Schnittflächen der Organe zeigen die Reaktion ebenfalls und Heffter folgert daraus, daß in tierischen Organen Substanzen vorkommen, die sich gegen Nitroprussidnatrium wie SH-Verbindungen verhalten. Sehr wichtig ist die Feststellung Heffters, daß die fein verteilten Schwefel nicht zu Schwefelwasserstoff reduzierenden Eiweißkörper (Fibrin, Serumeiweiß, Casein, Ovomuroid) diese Reaktion nicht geben; da das Cystein nach Heffter schon bei gewöhnlicher Temperatur Schwefel reduziert, so wird damit ein weiterer Beweis gewonnen, daß es tatsächlich Cysteingruppen sind, welche die Reaktion gewisser Eiweißkörper verursachen.

In einer früheren Arbeit²⁾ hat Heffter festgestellt, daß es das Ovalbumin des Eiklars ist, welchem die Eigenschaft zukommt, Schwefel zu Schwefelwasserstoff zu reduzieren, und daß diese Eigenschaft auch durch Aufkochen nicht verloren geht. Unrichtig jedoch ist seine Behauptung, daß ein durch peptische Verdauung von Eierweiß entstehendes Albumosen-Pepton-Gemenge nicht mehr die Fähigkeit besitzt, SH_2 zu bilden. Da

¹⁾ A. Heffter, Die reduz. Bestandteile d. Zelle. Mediz.-nat. Archiv, Bd. I. Ref. i. Jahrber. ü. d. F. d. Tierchemie, Bd. XXXVII, S. 565.

²⁾ M. Hausmann und A. Heffter, Über d. Wirkung d. Schwefels auf Eiweißkörper. Hofmeisters Beiträge, Bd. V, 1904. Auch A. Heffter, Beiträge zur Pharmakologie d. Schwefels. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. LI. Referat in Jahr. f. Tierchemie, Bd. XXXIV, 1904.

ein solches Gemenge — wie in dieser Arbeit mitgeteilt wurde — eine intensive Nitroprussidreaktion gibt, so wäre, die Richtigkeit der Angabe Heffters vorausgesetzt, anzunehmen, daß doch beide Eigenschaften nicht auf dieselbe Ursache zurückzuführen wären. Ich habe jedoch gefunden, daß ein solches Gemenge nach der Neutralisation feinverteilten Schwefel ziemlich energisch zu SH_2 reduziert.

Heffter fand weiter, daß die mit FeCl_3 und CuSO_4 erzeugten Albuminate Schwefel nicht mehr reduzieren.

Bezüglich der tierischen Organe hat bereits J. de Rey-Pailhade angegeben, daß dieselben SH_2 aus Schwefel bilden. Dieser Vorgang wurde von diesem Autor auf ein Philothion genanntes Ferment zurückgeführt, welches zu den Hydrogenasen oder Reduktasen gehören sollte. Heffter bestätigt diese Angaben de Rey-Pailhades, soweit sie sich auf die Bildung von SH_2 aus Schwefel beziehen; die Philothionhypothese wird jedoch von ihm zurückgewiesen, da die Reduktion des Schwefels zu SH_2 durch die Einwirkung der Siedetemperatur nicht aufgehoben wird. Er beobachtete dabei, wenn er frische Leber in siedendes Wasser eintrug und die Mischung einige Zeit im Sieden erhielt, daß dann sowohl das Filtrat wie der Rückstand die SH_2 -Reaktion gab. Wurde jedoch in diesem Filtrat alles Eiweiß durch erneutes Aufkochen unter Zusatz von verdünnter Essigsäure ausgefällt und abfiltriert, so verhielt sich das Filtrat gegen Schwefel negativ. Er schloß aus dieser Beobachtung, daß die SH_2 -bildende Eigenschaft des Lebergewebes zum größeren Teil durch einen unbekanntem eiweißartigen Bestandteil bedingt ist, der auch nach dem Erhitzen auf 100° noch wirksam ist. Diese Ansicht Heffters besteht nicht zu Recht, da die Organextrakte nach Ausfällung der Eiweißkörper noch eine kräftige positive Farbenreaktion mit Nitroprussidnatrium zeigen und auch Schwefel zu SH_2 reduzieren.

Heffter nimmt an, daß die nicht reduzierenden Eiweißkörper den Schwefel wahrscheinlich in cystinartiger Bindung $\text{R} \cdot \text{S} - \text{S} \cdot \text{R}$ enthalten, während die «philothionischen» Eiweißstoffe Cystein enthalten. Eine Bestätigung dieser Ansicht kann man in dem Umstand finden, daß es tatsächlich gelingt, durch

Reduktion vermittelt Sn und HCl nicht reagierende Eiweißkörper in reagierende umzuwandeln (z. B. aus Witte-Pepton positiv reagierende Albumosen zu gewinnen), so, wie durch Reduktion Cystein aus Cystin hervorgeht.

Übrigens konnte ich in Extrakten aus allen Organen Cystein nachweisen; die lebende Zelle wird also wohl auch die Möglichkeit besitzen, inaktive Cystingruppen in den Organ-eiweißkörpern in aktive Cysteingruppen umzuwandeln.

Der leicht bewegliche H dieser Cysteingruppen übt aber nicht nur eine Reduktionswirkung aus, er ist auch nach Heffter imstande, den molekulären O_2 zu spalten und ihn dadurch zu aktivieren. Hierdurch wäre wenigstens teilweise die O_2 -Affinität der Zellen zu erklären. Damit wäre das Vorkommen mit Nitroprussidnatrium positiv reagierender Eiweißstoffe in allen tierischen Zellen und ihre Bedeutung für den Lebensprozeß erklärt, während sie im Bindegewebe, welches einen nur trägen Stoffwechsel besitzt, nicht nachgewiesen wurden.