

Die Mischung von 5.0 g Trimethylglucose, 40 g *o*-Kieselsäure-methylester, 20 g absol. Methanol und 0.3 g Acetylchlorid blieb 24 Stdn. bei 20° stehen. Unter Kühlung wurden 100 ccm einer 30-proz. Kalilauge zugegeben. Durch Ausäthern und Destillieren (0.4 mm) wurden 5.06 g Glucosid (95 % d. Th.) gewonnen.

Durch *o*-Ameisensäure-methylester, Methanol und Chlorwasserstoff wird der Methylzucker in der Kälte zwar langsam glucosidiert, aber immerhin schneller als in Abwesenheit des Esters. Dagegen führt Acetylchlorid auch hier in der Kälte zum Ziel. Im Gegensatz zu der von Claisen für die Bereitung der Enoläther angewendeten Mischung muß außer dem *o*-Ameisensäure-methylester Methanol anwesend sein; ein anderer Unterschied besteht darin, daß sehr geringe Mengen Acetylchlorid genügen. Ohne *o*-Ester tritt keine nennenswerte Umsetzung ein.

Die Mischung von 5.0 g Trimethylglucose, 25 g *o*-Ameisensäure-methylester, 15 g absol. Methanol und 0.2 g Acetylchlorid blieb 20 Stdn. bei 20° stehen. Nach dem Wegdampfen wird das zurückgebliebene Glucosid bei 0.4 mm destilliert. Erhalten wurden 5.1 g = 96 % d. Theorie.

22. Morizo Ishidate und Takeichi Sakaguchi: Über den Nachweis von nativem Eiweiß mit p_{H} -Indicatoren.

[Aus d. Pharmazeut. Institut d. Universität Tokio.]

(Eingegangen am 15. November 1940.)

Vor kurzem teilten Feigl und Anger¹⁾ eine neue Reaktion zum Nachweis von Eiweiß mit, die auf der Auswertung des Proteinfehlers bei der Anwendung von Tetrabromphenolphthaleinester als p_{H} -Indicator beruht. Diese Reaktion ist nach unseren eingehenden Versuchen über die Brauchbarkeit anderer p_{H} -Indicatoren gegenüber den anderen zahlreichen bekannten Eiweißreaktionen durch die hohe Spezifität gegen natives Eiweiß ausgezeichnet. Von den bekannten p_{H} -Indicatoren standen uns 27 zur Verfügung, die auch zum Nachweis von Eiweiß verwendet wurden, jedoch nur mit 10 p_{H} -Indicatoren konnten unter den Bedingungen der Tüpfelreaktion bei Gegenwart von Eiweiß in Abhängigkeit von der Menge mehr oder weniger positive Reaktionen erzielt werden. Tafel 1 zeigt die Grenzkonzentrationen bzw. Erfassungsgrenzen der untersuchten Eiweißarten bei Anwendung dieser Farbindicatoren.

Versuchsbedingungen: Ein Tropfen (0.05 ccm) einer eiweißhaltigen Lösung wird auf der Tüpfelplatte mit einem Tropfen eines Indicators versetzt und mit 1 oder 2 Tropfen einer Säurelösung (Essigsäure, Trichloressigsäure oder Salzsäure) bzw. einer Alkalilösung in einer zum Indicator geeigneten Konzentration vermischt. Bei Vorhandensein von Eiweiß bleibt der Farbton der Lösung bestehen, während die Farbe der Kontrollösung vollkommen umschlägt. Die folgenden Indicators lieferten bei der 1-proz. Lösung von Casein, Hämoglobin, Ovalbumin und 5-proz. Gelatine keine Reaktion: Phenolphthalein (Umschlagsgrenzen: p_{H} 8.2—10.0), Thymolphthalein (9.3—10.5), α -Naphtholphthalein (7.0—9.0), Methylrot (4.2—6.3), Neutralrot (6.8—8.0), Phenolrot (6.8—8.0), Kresolrot (7.2—8.8), Diäthylrot (4.5—6.5), Lackmoid (4.4—6.3), Lackmus (5.0—8.0), Thymolblau (8.0—9.6), Bromthymolblau (6.0—7.6), Tropäolin 0 (11.0—13.0), Bromkresolpurpur (5.2—6.8), Malachitgrün (0.0—2.0), Alizarin gelb (10.1—12.1), alizarinsulfonsaures Na (3.7—5.2).

¹⁾ Mikrochim. Acta 2, 107 [1937]; vergl. auch F. Feigl: Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen, 4. Aufl., 1938, S. 455.

Tafel 1.

Indicatoren	Umschlagsintervall (pH)	Grenzkonzentration (%) und Erfassungsgrenze (γ)			
		Casein	Hämoglobin	Ovalbumin	Gelatine
1. Tetrabromphenolphthalein-äthylester-K	4.5—5.5	0.004	0.005	0.005	0.005 (%)
		2	2.5	2.5	2.5 (γ)
2. Kongorot	3.0—5.2	0.05	0.05	0.05	0.1
		25	25	25	50
3. Bromphenolblau	3.0—4.6	0.02	0.03	0.05	0.05
		10	15	25	25
4. Dimethylgelb	2.9—4.0	0.002	0.005	0.005	0.13
		1	2.5	2.5	65
5. Metanilgelb	1.2—2.3	0.015	0.03	0.05	0.25
		8	15	25	125
6. <i>p</i> -Benzolsulfonsäureazobenzylanilin	2.0—3.3	0.02	0.03	0.05	0.5
		10	15	25	250
7. Thymolblau	1.2—2.8	0.1	0.1	0.2	1
		50	50	100	500
8. Bromkresolgrün	3.8—5.4	0.15	0.2	0.25	1
		80	100	125	500
9. Tropäolin 00	1.4—2.6	0.25	0.25	0.25	0.3
		125	125	125	150
10. Methylorange	3.1—4.4	0.25	0.5	0.5	—
		125	250	250	—

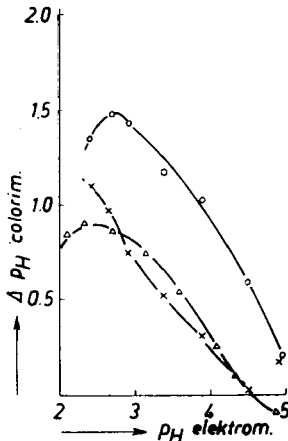
Aus der Tafel 1 ist ersichtlich: 1) die reaktionsfähigen Farbstoffe sind solche, deren Umschlagsintervall ausnahmslos in saurem Gebiete liegt; 2) Tetrabromphenolphthaleinester hat die kleinsten Erfassungsgrenzen und Kongorot, Bromphenolblau, Dimethylgelb und Metanilgelb sind auch empfindlich genug, um zur qualitativen Eiweißbestimmung verwendet werden zu können; 3) verschiedene Eiweißarten können gegen einen bestimmten Farbstoff mehr oder weniger verschiedene Erfassungsgrenzen aufweisen, was wahrscheinlich von ihrem Mol.-Gew. abhängt; so hat Casein, dessen Mol.-Gew. nach unserer heutigen Kenntnis kleiner ist als das der anderen 3 Eiweißarten, eine höhere Empfindlichkeit, während Gelatine mit dem größeren Mol.-Gew. eine geringere Empfindlichkeit aufweist.

Die Proteinlösungen erniedrigen, wenn sie durch Erhitzen mit 2-*n* Salzsäure oder Natronlauge abgebaut wurden, ihre Empfindlichkeit gegen die genannten Farbstoffe nur unbedeutend, mit Ausnahme gegen Tetrabromphenolphthaleinester, so daß der letztgenannte einen vorzüglichen Indicator zum Nachweis von nativem Eiweiß darstellt.

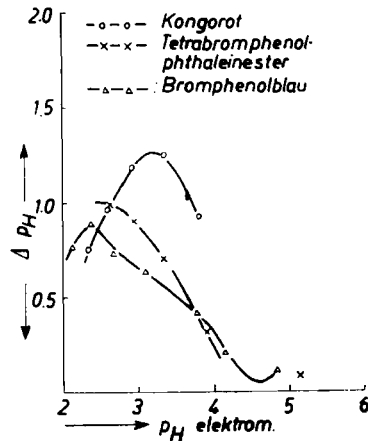
Eiweißabbauprodukte wie Pepton, Aminosäuren, einige amphotere Körper wie Lecithin, und ein Kolloid wie Seifenlösung reagieren gegen die genannten Farbstoffe sehr träge. In hoher Konzentration jedoch sind sie nicht ganz negativ, während sich neutrale kolloidale Substanzen wie Stärke, Agar-Agar und Gummi arabicum in noch höherer Konzentration fast reaktionslos erweisen. Die Anwesenheit mäßiger Salzmengen bei der Tüpfelreak-

tion beeinflußt die Reaktionsintensität überhaupt nicht, unter der Voraussetzung, daß man je nach der Pufferwirkung der Salze genügend starke Säuren anwendet, damit die salzhaltige Lösung eine für den Farbumschlag erforderliche Wasserstoffionenkonzentration behält.

Das Ausmaß des Proteinfehlers verschiedener Farbstoffe wird durch die Abweichung zwischen den colorimetrischen und elektrometrischen p_H -Werten gemessen. Abbild. 1 und 2 ergeben die p_H -Abweichungskurven der wich-



Abbild. 1a. Abweichungen des p_H in 1-proz. Gelatinelösung.



Abbild. 1b. Abweichungen des p_H in 0.1-proz. Gelatinelösung.

tigsten Indicatoren bei den verschiedenen Wasserstoffkonzentrationen in Gelatine- und Albuminlösung. Je größer die Abweichung eines Farbstoffes ist, desto günstiger muß er für den Eiweiß-Nachweis sein. Es ist jedoch bemerkenswert, daß der Abweichungswert des Kongorots den des Tetrabromphenolphthaleinesters übertrifft, trotzdem die Empfindlichkeit des Kongorots, die mittels der Tüpfelreaktion gefunden wird, geringer ist, da nämlich bei der Tüpfelreaktion die Werte der minimalen Eiweißmenge nur subjektiv durch die deutliche Umfärbung der Lösung abgeschätzt werden.

Wird die Kurve von 1-proz Gelatinelösung mit der von 0.1-proz Lösung und die Kurve von 0.2-proz. Albuminlösung mit der von 0.1-proz. Lösung verglichen so bemerkt man, daß die Konzentrationsänderung des Eiweißes auf den Verschiebungswert des p_H fast keinen Einfluß ausübt, mit anderen Worten, die Konzentration des Eiweißes von dem Farbton der Lösung fast unabhängig ist. Ebenso wenig beeinflußt die zugesetzte Menge der Indicatoren den Verschiebungswert (Versuchsteil S. 170). Daher scheint die colorimetrische Eiweißbestimmung mittels dieser Reaktion unmöglich zu sein. Nach den eingehenden Versuchen, den Albumingehalt mit Hilfe von Tetrabromphenolphthaleinester bzw. Bromphenolblau zu messen, sind, wie aus Abbild. 3 ersichtlich, tatsächlich die colorimetrischen Werte der Lösungen von einer höheren Konzentration als 0.02-proz. fast dieselben, und nur in sehr verdünnten Lösungen — unter 0.02-proz. — ändern sich die Werte mit der Konzentration. Auf Grund dieser Ergebnisse kann man wohl den Mechanismus des Protein-

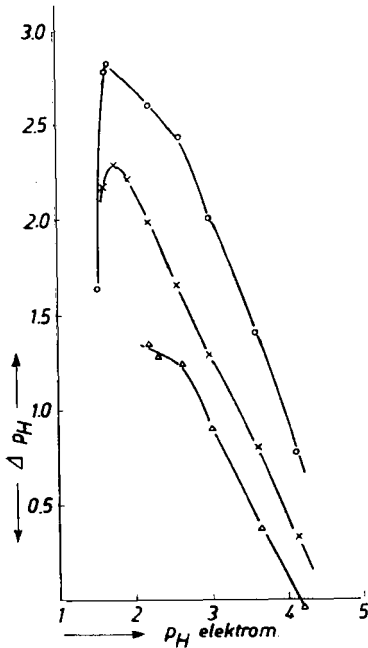


Abbildung 2a. Abweichungen des p_H in 0.2-proz. Albuminlösung.

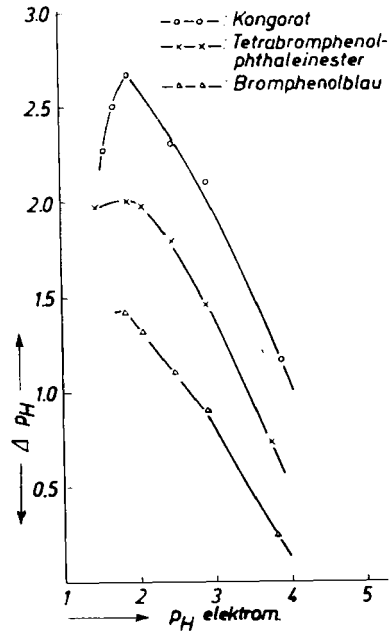


Abbildung 2b. Abweichungen des p_H in 0.1-proz. Albuminlösung.

fehlers so erklären, daß der amphotere Charakter des Eiweißes eine viel größere Rolle spielt als die kolloidalen Eigenschaften, bzw. der Proteinfehler hauptsächlich auf die Ionenbindung zwischen dem dissoziierten Eiweiß-

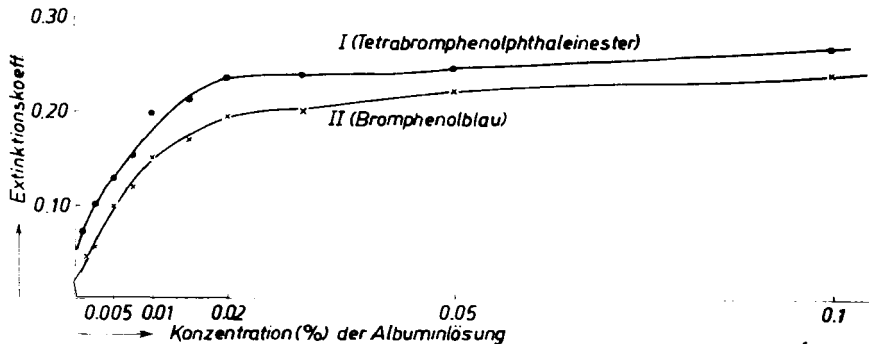


Abbildung 3. Lichtabsorption in Albuminlösung. I = mit Tetrabromphenolphthaleinester, II = mit Bromphenolblau.

Zwitterion und Farbstoffion zurückzuführen ist. Nach Gutbier und Brintzinger²⁾ und auch Ostwald³⁾ und Thiel⁴⁾ ist jedoch die Verschiebung des Farbumschlags von Indicatoren (besonders bei Kongorot) teils auf die Teil-

²⁾ Kolloid-Ztschr. 41, 1 [1927].

³⁾ Kolloid-Ztschr. 24, 67 [1919].

⁴⁾ Ztschr. anorgan. allgem. Chem. 220, 25 [1934].

chenverringerng des Farbstoffes durch hydrophile Kolloide wie Eiweiß und teils auf die Pufferwirkung der Eiweißlösung zurückzuführen. Diese beiden Wirkungen würden aber für den Proteinfehler bei unserer Reaktion nur geringfügige Bedeutung haben.

Schließlich wollen wir noch auf die Tatsache aufmerksam machen, daß sich die Maxima der Abweichung des p_H , soweit die Messungen erlauben, gerade an der Stelle der isoelektrischen Reaktion des Eiweißes und deren Minima in der Nähe von p_H 2.5 befinden und diese Extreme ohne weiteres denen bei der Ionisation des Eiweißes entsprechen wie es bei vielen anderen Erscheinungen des Eiweißes (Quellung, Oberflächenspannung, optischem Verhalten usw.) der Fall ist.

Beschreibung der Versuche.

1. Bestimmung der Grenzkonzentration bzw. Erfassungsgrenze der Eiweißarten (Tafel 1): Die zu der Untersuchung verwendeten Eiweißarten waren Präparate von E. Merck. Zur Bestimmung der Grenzkonzentration mittels der Tüpfelreaktion unter den vorliegenden Bedingungen wurden folgende Lösungen der Farbstoffe und der Säuren verwendet:

Farbstofflösungen	Säuren
1. Tetrabromphenolphthaleinester (T. B. P.)	0.1 %, alkoholisch $n/5$ -Essigsäure
2. Kongorot (K. R.)	0.02 %, alkoholisch $n/5$ -Essigsäure
3. Bromphenolblau (B. B.)	0.02 %, alkoholisch $n/5$ -Essigsäure
4. Dimethylgelb (D. G.)	0.02 %, alkoholisch $n/100$ -Trichloressigsäure oder -Salzsäure
5. Metanilgelb (M. G.)	0.01 %, wäßrig $n/30$ -Trichloressigsäure oder -Salzsäure
6. <i>p</i> -Benzolsulfonsäure-azobenzylanilin (B. A.)	$n/5$ -Essigsäure
7. Thymolblau (T. B.)	0.025 %, wäßrig $n/30$ -Trichloressigsäure
8. Bromkresolgrün (B. G.)	0.1 %, alkoholisch $n/10$ -Essigsäure
9. Tropäolin 0 (T. O.)	0.1 %, wäßrig $n/100$ -Trichloressigsäure
10. Methylorange (M. D.)	0.05 %, wäßrig $n/20$ -Essigsäure

2. Erfassungsgrenze der denaturierten Eiweißstoffe: 0.2 g des Eiweißes wurden mit 10 ccm einer 2-n. Salzsäure bzw. Natronlauge im siedenden Wasserbade 1—4 Stdn. erhitzt. Nach der Neutralisation wurde die Lösung zur Bestimmung der Erfassungsgrenze verwendet (Tafel 2):

Tafel 2.

Indicatoren	Zeit der Erhitzung in Stdn.	Erfassungsgrenze (in γ)							
		Casein mit		Hämoglobin mit		Ovalbumin mit		Gelatine mit	
		2-n. HCl	2-n. NaOH	2-n. HCl	2-n. NaOH	2-n. HCl	2-n. NaOH	2-n. HCl	2-n. NaOH
1. T. B. P.	1	7.5	250	4		8	30	250	
	4	30		15	50	65	50	250	250
2. K. R.	1	15		4		15	7.5	30	
	4	15	25	8	25	30	25	15	50
3. B. B.	1	30		15		30	30	65	
	4	30	50	30	25	65	50	30	125
4. D. G.	1	30		65		30	3	65	
	4	30	25	65	25	125	25	30	50
5. M. G.	1	30		15		30	30	65	
	4	65	25	15	—	65	—	65	50

3. Prüfung anderer Körper: Das zur Prüfung angewandte Material war Pepton (nach Teraushi), Glycylglycin, Glykokoll, Lecithin (von Takeda A.-G.), Amylum soluble, Agar-Agar, Gummi arabicum und Sapo medicatus (nach der japanischen Pharmacopoea). Die Arbeitsweise war dieselbe wie oben.

Tafel 3.

Konzentration der Lösung	T. B. P.	C. R.	B. B.	D. G.	M. G.
Pepton 1%	±	+	±	+	+
0.5%	---	±	±	±	---
0.1%	---	---	---	---	---
Glycylglycin und } 1%	---	±	±	±	±
Glykokoll } 0.5%	---	---	---	---	---
Lecithin 1%	±	±	---	+	+
0.5%	---	---	---	+	+
0.1%	---	---	---	---	---
Stärke 1%	---	---	---	---	---
0.5%	---	---	---	---	---
Agar-Agar 1%	---	---	---	---	---
0.5%	---	---	---	---	---
Gummi arabicum { 2%	±	±	±	---	---
1%	---	---	---	---	---
Seife 1%	+	---	±	±	±
0.5%	---	---	---	---	---

+ positive Reaktion, -- negative Reaktion, ± sehr schwach positive Reaktion.

4. Die Messung der Abweichung in Gelatinelösung.

Die p_H -Werte der mit verschiedenen Mengen Salzsäure angesäuerten Eiweißlösungen wurden einerseits durch Vergleichen mit den Clark'schen Pufferlösungen unter Zusatz einer bestimmten Menge einer Indicatorlösung (je 0.2 ccm einer 0.1-proz. Indicatorlösung zu 10 ccm der Eiweißlösung) colorimetrisch abgeschätzt. Andererseits wurden dieselben Lösungen mit der Wasserstoffelektrode elektrometrisch bestimmt.

A) Die Bestimmung in 1-proz. Gelatinelösung.

Kongorot

p_H colorimetrisch	5.1	5.0	5.0	4.57	4.36	4.14	3.75
p_H elektrometrisch	4.89	4.50	3.92	3.42	2.90	2.68	2.41
Δp_H	0.21	0.50	1.08	1.15	1.46	1.51	1.34

Tetrabromphenolphthaleinester

p_H colorimetrisch	5.1	4.51	4.22	3.98	3.63	3.60	3.50
p_H elektrometrisch	4.89	4.50	3.92	3.42	2.90	2.63	2.41
Δp_H	0.21	0.01	0.3	0.56	0.73	0.97	1.09

Bromphenolblau

p_H colorimetrisch	4.75	4.42	4.25	4.2	4.0	3.6	3.24	2.94
p_H elektrometrisch	4.86	4.33	4.03	3.65	3.27	2.74	2.36	2.11
Δp_H	-0.11	0.09	0.22	0.55	0.73	0.86	0.88	0.83

B) Die Bestimmung in 0.4-proz. Gelatinelösung.

Bromphenolblau

pH colorimetrisch	4.75	4.43	4.23	3.88	3.5	3.28	2.95
pH elektrometrisch	4.86	4.21	3.82	3.22	2.76	2.88	2.20
ΔpH	—0.11	0.22	0.41	0.66	0.74	0.90	0.75

C) Die Messung in 0.1-proz. Gelatinelösung.

Kongorot

pH colorimetrisch	4.8	4.6	4.14	3.50	3.12
pH elektrometrisch	3.88	3.36	2.97	2.56	2.35
ΔpH	0.92	1.24	1.17	0.94	0.77

Tetrabromphenolphthaleinester

pH colorimetrisch	5.4	4.22	4.06	3.87	3.52
pH elektrometrisch	5.35	3.88	3.36	2.97	2.56
ΔpH	0.05	0.34	0.70	0.90	0.96

5. Die Bestimmung der Abweichung in Albuminlösung.
(Abbild. 2a und 2b.)

A) Die Bestimmung in 0.2-proz. Albuminlösung.

Kongorot

(0.5 ccm der 0.04-proz. Lösung zu je 5 ccm der Albuminlösung)

pH colorimetrisch	5.0	5.0	5.0	5.0	4.80	4.7	4.4	3.2
pH elektrometrisch	4.16	3.60	3.0	2.58	2.20	1.87	1.62	1.53
ΔpH	0.84	1.40	2.0	2.42	2.60	2.83	2.78	1.67

Tetrabromphenolphthaleinester

(0.1 ccm der 0.1-proz. Indicatorenlösung zu je 5 ccm der Albuminlösung)

pH colorimetrisch	4.5	4.4	4.3	4.25	4.15	4.05	4.0	3.8
pH elektrometrisch	4.16	3.60	3.00	2.58	2.20	1.87	1.72	1.62
ΔpH	0.34	0.80	1.30	1.67	1.95	2.18	2.28	2.18

Bromphenolblau

(0.1 ccm der 0.1-proz. Indicatorenlösung zu je 5 ccm der Albuminlösung)

pH colorimetrisch	4.1	4.0	3.9	3.8	3.6	3.55
pH elektrometrisch	4.16	3.62	3.00	2.58	2.32	2.20
ΔpH	—0.06	0.38	0.90	1.22	1.28	1.35

B) Die Bestimmung in 0.1-proz. Albuminlösung.

(Die Arbeitsweise ist dieselbe wie oben.)

Kongorot

pH colorimetrisch	5.0	5.0	4.8	4.6	4.25	3.8
pH elektrometrisch	3.84	2.90	2.50	1.95	1.73	1.53
ΔpH	1.16	2.10	2.30	2.65	2.52	2.27

Tetrabromphenolphthaleinester

pH colorimetrisch	4.5	4.35	4.3	4.05	3.85	3.5
pH elektrometrisch	3.76	2.90	2.50	2.09	1.84	1.51
ΔpH	0.74	1.45	1.80	1.96	2.01	1.99

Bromphenolblau

pH colorimetrisch	4.0	3.8	3.6	3.4	3.25
pH elektrometrisch	3.76	2.90	2.50	2.09	1.84
ΔpH	0.24	0.90	1.10	1.31	1.41

6. Die Bestimmung der Abweichung in 0.7-proz. Peptonlösung.

Kongorot

pH colorimetrisch	4.86	4.62	4.62	4.35	3.71
pH elektrometrisch	4.80	4.30	4.21	3.83	3.30
ΔpH	0.06	0.32	0.41	0.52	0.41

Tetrabromphenolphthaleinester

p_{H} colorimetrisch	5.5	5.16	4.86	4.44	4.30	4.08
p_{H} elektrometrisch	5.50	5.09	4.80	4.30	4.21	3.83
Δp_{H}	0	0.07	0.06	0.14	0.09	0.25

Bromphenolblau

p_{H} colorimetrisch	4.40	4.24	3.90	3.42
p_{H} elektrometrisch	4.30	4.21	3.83	3.30
Δp_{H}	0.1	0.03	0.07	0.12

7. Der Einfluß der Indicatormenge auf die Abweichung des p_{H} .

Zu je 10 ccm der mit Salzsäure angesäuerten 1-proz. Gelatinelösung wurden verschiedene Mengen von 0.1-proz. Kongorotlösung zugegeben, und die Gelatinelösungen colorimetrisch und elektrometrisch verglichen. Aus den Ergebnissen ersieht man, daß die Menge des Indicators vom Abweichungswert des Indicators unabhängig ist.

Zugegebene Kongorotlösung in ccm	p_{H} colorimetr.	p_{H} elektrometr.
0	—	3.91
0.2	5.1	3.86
0.6	5.1	3.80
1.0	5.2	3.87

8. Die colorimetrische Bestimmung des Eiweißgehaltes.

Zu je 10 ccm der Albuminlösung von verschiedener Konzentration wurde 0.1 ccm der 0.1-proz. Tetrabromphenolphthalein-äthylester-kaliumlösung bzw. der 0.02-proz. Bromphenolblaulösung und 0.25 ccm einer $n/5$ -Essigsäure zugegeben, worauf sie im Leifo-Photometer (Filter: Nr. 620) colorimetrisch gemessen wurden, wobei die Absorptionskoeffizienten der Versuchslösungen unter Abrechnung des vom Eiweiß selbst stammenden Wertes ermittelt wurden.

Tafel 4. Lichtabsorption in Albuminlösung mit Tetrabromphenolphthaleinester und Bromphenolblau.

Konzentration des Albumins in %	Extinktionskoeff. mit Tetrabromphenol- phthaleinester	Extinktionskoeff. mit Bromphenolblau
0.001	0.07	0.047
0.0025	0.11	0.057
0.005	0.127	0.10
0.075	0.147	0.12
0.01	0.20	0.15
0.015	0.21	0.17
0.02	0.233	0.196
0.025	0.23	0.22
0.05	0.25	0.23
0.1	0.267	0.231
0.2	—	0.21