

Ein vereinfachtes Verfahren zur quantitativen Eiweißbestimmung

von

Adolf Jolles.

Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. M. und Dr. Ad. Jolles in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 17. April 1902.)

Von den exacten Methoden der quantitativen Eiweißbestimmung gelangen im wesentlichen die Abscheidung und Wägung des Eiweißes oder die Bestimmung desselben aus der Stickstoffmenge nach der Kjeldahl'schen Methode zur Anwendung. Obzwar beiden dieser Methoden gewisse geringe Mängel anhaften, so sind ihre Resultate ziemlich verlässlich, und für die nachstehend beschriebene Methode der Eiweißbestimmung war nicht der Gedanke maßgebend, die Genauigkeit zu erhöhen, sondern vielmehr das Bestreben nach leichterem Ausführbarkeit der Methoden, sowohl in Bezug auf die Zeitdauer, als auch auf die nothwendigen Hilfsmittel. Die vorgeschlagene Methode beruht im Principe darauf, dass die vorschriftsmäßig abgeschiedenen Eiweißkörper mit Permanganat in schwach saurer Lösung oxydiert werden und hierauf nach vorangegangener Neutralisation der Stickstoff in einem Azotometer durch unterbromigsaures Natron frei gemacht und gemessen wird. Hierbei liefert jeder Eiweißkörper einen bestimmten Procentsatz an Stickstoff, und umgekehrt kann man aus der gemessenen Stickstoffmenge den Eiweißgehalt berechnen. Nachdem durch viele Versuche für jeden Eiweißkörper die Constanz dieses Factors festgestellt wurde,¹ so ist

¹ Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie der Wissenschaften, Bd. CX, Abth. II b, Mai 1901.

diese Methode principiell der Kjeldahl'schen Bestimmung gleichzusetzen, hat aber den Vortheil der schnelleren und leichteren Ausführung. Diese Bestimmung dürfte sich namentlich für physiologisch-chemische Zwecke eignen, und es sei im folgenden beispielsweise ihre praktische Anwendung auf Harnen beschrieben.

Es ist anzunehmen, dass sie mit den gebotenen Abänderungen auch zu analogen Zwecken verwendet werden kann.

A. Quantitative Eiweißbestimmung im Harnen.

Die gewichtsanalytische Bestimmung liefert in der Regel exacte Resultate. Sie erfordert jedoch mehrere Wägungen und eine peinliche Sorgfalt bei der Trocknung des Eiweißniederschlags, da sonst leicht Zersetzungen und Umwandlungen eintreten können. Dazu kommt, dass es in schleimigen und zähflüssigen Harnen außerordentlich schwierig ist, die abgetrennten Eiweißkörper von den schleimigen Substanzen und dem Fällungsmittel völlig zu trennen, so dass in solchen Fällen das Wägen geringe Fehler nach sich ziehen würde. Um das zeitraubende Trocknen und wiederholte Wägen zu ersparen, wird vielfach in dem ausgewaschenen Coagulum der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt und aus demselben die Eiweißmenge berechnet. Nachdem im Harnen neben Serumalbumin auch Serumglobulin vorkommt, so hängt die Genauigkeit der Bestimmung von dem Factor ab, mit dem das Gewicht des gefundenen Stickstoffes multipliciert wird. Thatsache ist, dass durch Multiplication mit 6·3 in der Regel eine exacte Eiweißbestimmung resultiert. Nichtsdestoweniger kommen nach meinen vergleichenden Untersuchungen auch Harnen vor, bei welchen durch Multiplication des Stickstoffes mit 6·25, respective 6·35 die richtigen Werte resultieren.

Die praktische Ausführung nach diesen zwei Methoden ist ziemlich zeitraubend, und es hat sich daher naturgemäß ein Bedürfnis nach solchen Methoden ergeben, welche mit geringeren Ansprüchen an die technische Fertigkeit des Analytikers, mit einfacheren Hilfsmitteln und mit geringerer Zeitdauer das Eiweiß im Harnen zu bestimmen gestatten. Hieher

gehört die polarimetrische Bestimmung, die aber zu ungenauen Resultaten führt, da im Harn bei Albuminurie gewöhnlich zwei verschiedene Eiweißkörper von verschiedener spezifischer Drehung enthalten sind. Auch die densimetrische Methode, welche darauf beruht, dass das spezifische Gewicht des Harnes vor und nach der Abscheidung des Eiweißes mittels des Pyknometers bestimmt und die Differenz in dem spezifischen Gewichte mit der Zahor'schen Zahl (400) multipliziert wird, liefert ungenaue Resultate. Das Verfahren von Roberts und Stolnikoff in der Modification von Brandberg, welches auf der Erfahrung beruht, dass bei der Eiweißprobe nach Heller die Ringbildung umso früher eintritt, je eiweißreicher die Flüssigkeit ist, hat nur den Charakter einer Schätzungsmethode und liefert noch ungenauere Resultate als die vorhergenannten Methoden.

Die vielfach in Verwendung stehende Esbach'sche Methode, welche im Principe auf der Bestimmung der Eiweißmenge aus der Höhe des Niederschlages beruht, der sich bei Anwendung des Esbach'schen Reagens in 24 Stunden bildet, liefert ungenaue Resultate, die zuweilen, namentlich in zähflüssigen und eiterigen Harnen absolut unbrauchbar sind.

Auch die in Vorschlag gebrachten maßanalytischen Bestimmungsmethoden geben wenig befriedigende Resultate.

Wir sehen somit, dass eine vereinfachte verlässliche Methode zur quantitativen Bestimmung des Albumins im Harn einem thatsächlich vorhandenen Bedürfnisse entspricht. Ich habe vor etwa zwei Jahren zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure im Harn statt der gewichtsanalytischen, respective titrimetrischen Methode die Messung des aus diesen Körpern nach vorangegangener Oxydation durch unterbromigsaures Natron entwickelten Stickstoffes vorgeschlagen.¹ Diese Methode ist in der »Chemiker-Zeitung«² von O. Makowka einer eingehenden Nachprüfung unterzogen worden, und Verfasser gelangt auf Grund seiner Resultate zu dem Ergebnisse, dass meine Methode »als eine vollkommen zuverlässige und exacte

¹ Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. XXX, S. 222.

² Chemiker-Zeitung, 1901, 25, Nr. 103.

bezeichnet werden kann, die wegen der relativen Einfachheit in der Ausführung vollste Beachtung in der Praxis verdient«.

Im nachstehenden beschreibe ich ein analoges Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Eiweißes im Harne. Die hier in Betracht kommenden Eiweißkörper spalten bei entsprechend geleiteter Oxydation — wie ich bereits früher gezeigt habe¹ — die Hauptmenge des Stickstoffes in Form von Harnstoff ab. Allerdings wird der Harnstoff, falls die Temperatur- und Concentrationsverhältnisse, sowie der Verlauf der Reaction nicht peinlich genau eingehalten werden, weiter in Ammoniak und Kohlensäure zerlegt, was jedoch für analytische Zwecke vollkommen gleichgiltig ist, nachdem bekanntlich Ammoniaksalze durch unterbromigsaures Natron ihren Stickstoff quantitativ in Gasform abgeben.

Um diejenige Stickstoffmenge festzustellen, welche die im Harne vorhandenen coagulierbaren Eiweißkörper nach der Oxydation durch unterbromigsaures Natron entwickeln lassen, habe ich den empirischen Weg eingeschlagen, indem ich aus einer großen Zahl eiweißhaltiger Harne den Stickstoff der abgeschiedenen Eiweißkörper sowohl volumetrisch, als auch nach Kjeldahl und zum Vergleiche die Eiweißkörper auch gewichtsanalytisch bestimmt habe. Wie aus den nachfolgenden Beleganalysen hervorgeht, ist das Verhältnis zwischen Eiweiß und entwickeltem Stickstoff für die praktisch in Betracht kommenden Fälle genügend constant und beträgt im Mittel 7·68, d. h. man muss das Gewicht des volumetrisch gemessenen Stickstoffes mit 7·68 multiplicieren, um die Eiweißmenge zu erhalten. Wengleich zugegeben werden muss, dass die Methode insofern mit einem kleinen Fehler behaftet ist, als der Factor 7·68 nicht in allen Fällen genau ist, so muss doch andererseits berücksichtigt werden, dass derselbe Einwand bezüglich der Ermittlung der Eiweißmenge aus dem Stickstoffgehalte nach Kjeldahl durch Multiplication mit 6·25 geltend gemacht werden kann.

Ich habe in meiner erwähnten Arbeit über die Eiweißkörper reines Serumalbumin, welches im wesentlichen den

¹ Sitzungsberichte der kaiserl. Akademie der Wissenschaften, Bd. CX, Abth. IIb, Mai 1901.

coagulierbaren Eiweißkörper des Harnes darstellt, nach derselben Methode behandelt und ein nahezu übereinstimmendes Verhältnis gefunden.

Die Ausführung der Methode ist folgende: Man bringt ein bestimmtes Volumen möglichst frischen Harnes — bei eiweißreichem 25 oder 50 cm^3 , sonst 100 cm^3 — in ein Becherglas und macht denselben durch vorsichtigen Zusatz einiger Tropfen verdünnter Essigsäure ganz schwach sauer, versetzt mit etwas Kochsalzlösung und erhitzt unter beständigem Umrühren bis zum Sieden. Der Niederschlag wird rasch auf einem Filter gesammelt und mit heißem Wasser chlorfrei gewaschen. Hierauf wird Filter sammt Niederschlag auf ein passendes Uhrglas ausgebreitet und mit warmem destilliertem Wasser in ein Becherglas von circa 500 cm^3 Inhalt quantitativ abgespritzt. Hierauf wird der Inhalt des Becherglases durch Abspritzen des Glasrandes mit destilliertem Wasser auf circa 300 bis 400 cm^3 gebracht, 5 cm^3 einer Schwefelsäurelösung vom specifischen Gewichte 1.4 hinzugesetzt und zunächst auf dem Drahtnetze erwärmt. Nun wird der Inhalt des Becherglases bei ruhigem Kochen so lange mit einer Kaliumpermanganatlösung von 8 g im Liter, und zwar zunächst je 1 cm^3 auf einmal versetzt, bis der letzte Permanganatzusatz beim Kochen der Flüssigkeit nicht mehr vollständig verschwindet, sondern sich unter Abscheidung von Braunstein zersetzt. In diesem Falle wird die Flüssigkeit weiter eingedampft, bis die Braunsteinabscheidung vollständig verschwindet und die Lösung klar erscheint. Hierauf setzt man von der Permanganatlösung je $\frac{1}{2}$ cm^3 so lange auf einmal zu, bis die durch den letzten Permanganatzusatz bedingte Braunsteinabscheidung nach circa viertelstündigem Kochen nicht mehr verschwindet. Alsdann ist der Oxydationsprocess beendet. Sollte während des Kochens der Inhalt des Becherglases circa 100 cm^3 betragen und der Oxydationsprocess noch nicht beendet sein — was bei eiweißreichen Harnen zuweilen vorkommt —, dann füllt man das Becherglas neuerdings mit destilliertem Wasser auf circa 400 cm^3 auf und setzt bei schwachem Kochen den Permanganatzusatz in der beschriebenen Weise bis zum Endpunkte der Reaction fort. Nunmehr entfernt man die am Boden des Gefäßes

sich absetzende geringe Braunsteinabscheidung mit einigen Körnchen reiner Oxalsäure und engt die Lösung durch Kochen auf circa 50 cm^3 ein. Alsdann lässt man die Flüssigkeit in einem Kühlgefäße erkalten und setzt vorsichtig circa 33procentige Natronlauge (335 g Ätznatron pro 1 l Wasser) cubikcentimeterweise bei beständigem Kühlen zu, bis sich ein flockiger Niederschlag abzuscheiden beginnt und Lackmuspapier gebläut wird; hiebei muss jedoch die Lösung auf circa 15 bis 20° erkaltet sein, damit nicht etwa gebildetes Ammoniak entweichen kann.

Die Bestimmung des Stickstoffes in dieser Lösung wird nun so durchgeführt, dass die Flüssigkeit im Schüttelgefäße eines Azotometers mit unterbromigsauerm Natron versetzt wird und das Volumen des entwickelten Stickstoffes gemessen wird. Es ist selbstverständlich, dass hiebei die Cautelen, welche bei der Gasanalyse erforderlich sind, eingehalten werden müssen. (Gleiche Temperaturen während des Versuches etc.) Bezüglich der Details der Ausführung verweise ich auf meine in den Sitzungsberichten publicierte volumetrische Methode zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure im Harne.

Aus dem gemessenen Volum wird mit Hilfe der bekannten Formel, respective der Tabelle das Gewicht des Stickstoffes gerechnet und durch Multiplication mit $7\cdot68$ das Gewicht des Eiweißes in der angewendeten Menge gefunden. Die Methode beansprucht bei einiger Übung circa 3 bis $3\frac{1}{2}$ Stunden.

Beleganalysen.

I. In 200 cm^3 Harn wurde der Albumingehalt gewichtsanalytisch bestimmt.

Gefunden $0\cdot3462\text{ g}$ Eiweiß,
pro Liter Harn $1\cdot7310\text{ g}$ Eiweiß.

II. Stickstoff nach Kjeldahl im getrockneten Eiweißniederschlage:

Vorgeschlagene Säure $20\cdot00\text{ cm}^3$.
Zurücktitrierte Lauge $12\cdot08\text{ cm}^3$.

Verbraucht . . . $7\cdot92\text{ cm}^3$ Lauge.

1 cm^3 Lauge = $7\cdot00505\text{ mg N}$.

Gefunden $55 \cdot 47999 \text{ mg}$ Stickstoff,
 pro Liter Harn $277 \cdot 39995 \text{ mg}$ Stickstoff.

$$\frac{\text{Eiweiß}}{\text{Stickstoff}} = \frac{346 \cdot 2}{55 \cdot 47999} = 6 \cdot 240 \text{ (theoretisch } 6 \cdot 25).$$

III. Volumetrische Bestimmung. Der aus 200 cm^3 Harn abgeschiedene Niederschlag wurde oxydiert und das Oxydationsproduct auf 250 cm^3 aufgefüllt.

- a) 100 cm^3 lieferten $15 \cdot 68 \text{ cm}^3$ N bei 14° C. und 745 mm Barometerstand.
 b) 100 cm^3 lieferten $15 \cdot 68 \text{ cm}^3$ N bei 14° C. und 745 mm Barometerstand.

$$1 \text{ cm}^3 \text{ N} = 1 \cdot 151 \text{ mg N.}$$

$$1 \cdot 151 \times 15 \cdot 68 \times 2 \cdot 5 = 45 \cdot 1192 \text{ mg N,}$$

$$\text{pro Liter Harn} = 225 \cdot 6 \text{ mg N.}$$

Verhältnis von Kjeldahl-N zum volumetrischen N:

$$= \frac{45 \cdot 1192 \times 100}{55 \cdot 480} = 81 \cdot 31.$$

Der Factor F , mit dem der volumetrisch gefundene Stickstoff multipliziert werden muss, um die Eiweißmenge zu erhalten, ist $= \frac{1731}{225 \cdot 6} = 7 \cdot 67.$

Aus der großen Zahl von durchgeführten Versuchen lasse ich nachstehend einige Ergebnisse tabellarisch folgen. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf den Eiweißgehalt von 100 cm^3 verschiedener Harne.

Laufende Nummer	Gramm Eiweiß	Stickstoff nach Kjeldahl		Stickstoff volumetrisch		Factor, mit dem der volumetrische N multipliciert werden muss, um das Eiweiß zu erhalten	Verhältnis von Kjeldahl zum volu- metrisch gefundenen N
		Gramm	Pro- cent	Gramm	Pro- cent		
1	0·1823	0·02905	15·93	0·02388	13·10	7·63	82·22
2	0·11425	0·01821	15·94	0·01476	13·92	7·74	81·06
3	0·2964	0·047275	15·95	0·03872	13·07	7·66	81·90
4	0·03025	0·004824	15·93	0·003951	13·06	7·66	81·94
5	0·3306	0·052645	15·93	0·04279	12·94	7·72	81·23
6	0·08828	0·014079	15·94	0·01139	12·90	7·75	80·93
7	0·07744	0·012398	16·01	0·01007	13·00	7·69	81·22
8	0·08052	0·012867	15·98	0·01059	13·15	7·60	82·30
9	0·4063	0·065089	16·02	0·05268	12·96	7·71	80·93
10	0·2518	0·040262	15·99	0·03287	13·05	7·66	81·14
Im Mittel...						7·68	81·48

Wir sehen aus den Zahlen, dass der Factor, mit dem man den volumetrisch entwickelten Stickstoff multiplicieren muss, um das Gewicht des Eiweißes zu erhalten, in allen betrachteten Fällen zwischen 7·60 bis 7·75 beträgt. Diese Differenzen sind so unbedeutend, dass man unbedenklich die Eiweißmenge durch Multiplication des gefundenen Stickstoffes mit der im Mittel resultierenden Zahl von 7·68 berechnen kann.

Das Verhältnis von Kjeldahl-Stickstoff zum volumetrisch gefundenen Stickstoffe beträgt im Mittel 81·48. Meine schon früher publicierten Versuche mit krystallisiertem Serumalbumin, dargestellt aus Pferdeblutserum nach Gürber, ergaben 81·10% volumetrisch entwickelbaren Stickstoff. Bei Vergleichung dieser Zahlen ist außerdem zu bedenken, dass im Harne neben Serumalbumin geringe Mengen von Serumglobulin zur Abscheidung gelangen. Jedenfalls beweisen die gefundenen Zahlen die Constanz der aus Harnalbumin nach erfolgter Oxydation entwickelbaren Stickstoffmenge.

Ich habe in einer Reihe von Harnproben den Albumin-gehalt einerseits gewichtsanalytisch, anderseits volumetrisch unter Berücksichtigung des Factors 7·68 bestimmt und lasse nachstehend einige Beleganalysen folgen:

Laufende Nummer	I. Gramm Eiweiß pro 100 cm^3 Harn, gewichtsanalytisch	II. Gramm Eiweiß pro 100 cm^3 Harn, volumetrisch	Differenz zwischen II und I in Procenten
1	0·1753	0·1762	+0·5
2	0·1480	0·1469	-0·8
3	0·0662	0·0665	+0·5
4	0·0209	0·0210	+0·3
5	0·5116	0·5106	-0·2
6	0·2432	0·2454	+0·9
7	0·0978	0·0973	-0·5
8	0·3041	0·3020	-0·7

Aus den obigen Daten ergibt sich, dass die nach der volumetrischen Methode erhaltenen Resultate nur minimale Differenzen gegenüber den gewichtsanalytisch gefundenen Zahlen aufweisen und in keinem Falle 1% übersteigen. Erwägt man, dass die volumetrische Methode weder eine Wage, noch eingestellte Lösungen beansprucht, eine geringere Zeitdauer als die gewichtsanalytische oder Kjeldahl'sche Methode erfordert und bei einiger Übung leicht durchführbar ist, so dürfte diese Methode in medicinisch-chemischen Laboratorien, an Kliniken und Krankenanstalten etc., wo fortlaufende Harnuntersuchungen zur Durchführung gelangen, einige Beachtung verdienen.

Vorstehende Untersuchungen lassen sich in Kürze, wie folgt, zusammenfassen:

Nachdem Verfasser bereits früher experimentell festgestellt hat, dass bei den Eiweißkörpern nach der Oxydation mit Permanganat in saurer Lösung ein bestimmter Antheil des Stickstoffes in solche Form übergeht, dass er bei der Behandlung mit unterbromigsaurem Natron als Gas entwickelt wird,

lässt sich zur Vereinfachung der quantitativen Eiweißbestimmung im Harn folgendes Verfahren vorschlagen:

Das Eiweiß wird in schwach essigsaurer Lösung durch Coagulation chlorfrei gewaschen, mit Permanganat in schwach saurer Lösung oxydiert und in einem Azotometer der entwickelte Stickstoff gemessen. Wie aus den Beleganalysen hervorgeht, erhält man durch Multiplication des Gewichtes des gemessenen Stickstoffes mit 7·68 die Eiweißmenge, welche in dem verwendeten Harnquantum vorhanden ist.
