Aus der Unterrichtsanstalt für Staatsarzneikunde der Universität in Berlin (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Strassmann).

Der quantitative Nachweis von Eiweißsubstanzen mit Hilfe der Präzipitinreaktion und seine Anwendung bei der Nahrungsmittelkontrolle.¹⁾

Von Dr. Arthur Schulz, I. Assistent der Unterrichtsanstalt.

Die im Februar 1901 erschienenen Arbeiten von Uhlenhuth (2), Wassermann und Schütze hatten für die gerichtliche Medizin die Lösung einer immer brennender sich gestaltenden Frage gebracht. Für eine andere, der gerichtlichen Medizin nahestehende Disziplin, die Nahrungsmittelchemie, wurden jene Arbeiten ebenfalls zum Ausgang wichtigen Fortschrittes.

Es war noch im selben Jahre, als Jess darauf aufmerksam machte, daß man in der biologischen Reaktion eine ausgezeichnete Methode zur Erkennung von Pferdeblut und Pferdefleisch habe. Die ersten praktischen Versuche nach dieser Richtung machte Uhlenhuth (3). Er hob hervor, wie wichtig die Reaktion für die Beurteilung der Zusammensetzung des Hackfleisches sei, vor allem für die Entscheidung der Frage, ob und welche minderwertigen Fleischsorten eventuell darin enthalten sind, wie z. B. Pferde-, Hunde- und Katzenfleisch. Er ermittelte auf biologischem Wege auch schon die Herkunft verschiedener, zum Teil bis ein Jahr alter geräucherter Pferde- und Schweineschinken und geräucherter Pferdemettwürste. Nach ihm stellten Gröning, Miessner und Herbst ähnliche Versuche an. Nötel erbrachte den Nachweis von Pferdefleisch auch in halbgar gebratenem Fleisch, Rupp in schwachgekochten Würsten. Für ein anderes Gebiet der Nahrungsmittelkontrolle zogen Sion und Laptas das Verfahren in Anwendung, als sie Verfälschungen von Kuhmilch mit minderwertiger Schafmilch und Verfälschungen von Molkereiprodukten (Käse) nachwiesen. Ottolenghi — 1902 (1) und 1903 (2) — ermittelte mit seiner Hilfe Eigelb in Teigwaren. Auch Uhlenhuth (4) empfahl 1902 das Eidotterantiserum zur Anwendung in der Nahrungsmittelchemie. Schütze (2) erprobte 1904 das Verfahren ebenfalls praktisch bei Eiernudeln, ferner bei eigelbhaltiger Margarine; auf Grund seiner Erfahrungen empfahl er es auch für Eiergrauen, Eierteigwaren, Eierkognak und zum Nachweis von Caseinen in Butter und Margarine. 1905 berichtet Uhlenhuth (5), daß er mit Eidotterantiserum ebenfalls schon Eigelbmargarine auf ihren Eigelbgehalt mit gutem Erfolge untersucht habe. Daß nicht bloß Eiweißkörper animalischer Herkunft imstande sind, Antikörper zu erzeugen, sondern auch solche pflanzlicher Herkunft, wies 1901 Kowarski nach. Er stellte ein für Weizenalbumosen spezifisches Serum her, mit dem er in einer Hafermehllösung eine Trübung nicht erzeugen konnte. Roggen- und Gerstenmehllösungen gaben ein positives Resultat, wenn auch eine geringere Trübung; Erbsenmehllösung gab eine sehr schwache Trübung. Schütze (1) impfte erfolgreich Tiere mit Roborat, Ottolenghi (1) erhielt außer für Weizenmehl auch Antisera für Maismehl und Bertarelli für Erbsen, Bohnen, Pferdebohnen, Linsen und Wicke. Endlich sei erwähnt, daß v. Rigler ein spezifisches Serum zum Nachweis von Honig erzeugte.

Die Beispiele könnten gewiß noch vermehrt werden, ihre Zahl beweist aber schon zur Genüge, ein wie großes Feld die biologische Forschung auf dem Gebiet der Nahrungsmittelchemie in kurzer Zeit sich erobert hat. Der Nachweis mancher Fälschung war bis dahin auf große, ja zum Teil unüberwindliche Schwierigkeiten gestoßen. Verhältnismäßig am günstigsten lagen noch die Dinge bei Pferdefleisch und Eigelb, den beiden Substanzen, mit denen es der Nahrungsmittelchemiker allerdings auch besonders oft zu tun hat¹⁾.

Der chemische Nachweis von Pferdefleisch wird nach Hasterlik durch die Bestimmung der Jodzahl des Fettes geführt oder nach Niebel und nach Mayrhofer durch die Bestimmung des Glykogengehalts. Die Methode von Hasterlik leistete Gutes, so lange es sich lediglich um Pferdefleisch oder um eine Mischung von Pferdefleisch und Rindfleisch handelte. Wenn aber Pferdefleisch neben Schweinefleisch nachgewiesen werden sollte, so war sie unsicher, weil Schweinefett wesentlich höhere Jodzahlen hat als Rinderfett. Der Glykogengehalt unterliegt schon an und für sich sowohl bei Pferde- wie bei Rindfleisch erheblichen Schwankungen. Dazu kommt, daß das Fleisch junger Rinder zuweilen den gleichen Glykogengehalt besitzt wie Pferdefleisch. Hier war die Unsicherheit bei einem Gemisch verschiedener Fleischsorten besonders groß. Auch gegen die Zuverlässigkeit der Methoden zum Nachweis des Eigelbs in Nahrungs- und Genußmitteln sind Bedenken geltend gemacht worden. Eigelb wurde aus dem Gesamtfettgehalt der Ware (Salzmann) oder aus der Jodzahl des aus dem eigelbhaltigen Nahrungsmittel extrahierten Fettes (Spaeth), drittens aus dem Gehalt an Lecithinphosphorsäure und an Gesamtposphorsäure in Verbindung mit dem Fettgehalt (Juckenack u. a.) berechnet. Wollte z. B. Salzmann den Eigelbgehalt in Eiernudeln bestimmen, so ermittelte er den Gesamtfettgehalt, zog hiervon den Fettgehalt des Weizenmehles der Eiernudeln ab und berechnete aus dem Rest die Menge des Eigelbs. Die Berechnung aus der Jodzahl nach Spaeth stützt sich darauf, daß die Jodzahl des Eieröles sehr erheblich niedriger liegt als die der Cerealienfette.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß die Einführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens für die Nahrungsmittelkontrolle einen großen Fortschritt bedeutete. Um so auffallender muß es erscheinen, daß dieses Verfahren, obwohl es im Experiment schon ausgedehnte Verwendung gefunden hat, noch nicht recht Eingang in die Praxis hat finden können. An der Neuheit der Methode kann es nicht liegen; sie hat davon nicht abgehalten, daß man sich mit ihr eingehend befaßte. Es scheint, als spielte ein anderes Moment hier eine Rolle. Betrachten wir einmal die Stellung des Gerichtsarztes, der sich vor Gericht über einen Blutbefund zu äußern hat, und vergleichen wir sie mit der Stellung eines Sachverständigen für Nahrungsmittelkontrolle. Der Gerichtsarzt hat nur die Aufgabe, sich über die Herkunft des Blutes auszulassen, die er auf biologischem Wege ermittelt hat. Die Frage, wieviel Blut er an einem Messer, einem Kleidungsstück etc. gefunden hat, wird ihm nicht gestellt. Es genügt dem Richter, zu wissen, es liegt Menschenblut vor oder nicht. Anders liegen die Dinge, wenn es sich um eine Verfälschung von Nahrungsmitteln handelt. Der bloße Nachweis einer solchen ist zur Bestrafung allerdings in der Regel schon genügend; um aber die Höhe der Strafe nach dem erzielten Vermögensvorteil bemessen zu können, dazu bedarf der Richter unter anderem auch der Angabe, in welchem Umfange Verfälschung geübt worden ist, wieviel Pferdefleisch z. B. einem Hackfleisch oder einer Wurst zugesetzt ist, wie gering der Gehalt an Eigelb in Teigwaren etc. ist. Die Aufgabe des Nahrungsmittelchemikers ist also eine weitergehende als die des Gerichtsarztes. Diesen besonderen Ansprüchen zu genügen, dazu reichte das biologische Verfahren aber bisher nicht aus, und deshalb unterblieb auch wohl meist seine Anwendung, während die bisher geübten chemischen Methoden in einzelnen Fällen quantitative Bestimmungen immerhin ermöglichten. Hier wies die biologische Methode also noch eine Lücke auf, und so lange diese bestand, blieb sie für die Nahrungsmittelchemie in der Hauptsache nur ein interessantes Experiment, das wohl gelegentlich zur Bestätigung oder Ergänzung der chemischen Methode angestellt wurde, aber nicht die Kraft besaß, diese Methode zu

¹⁾ Ich verdanke die folgenden Angaben, die ein Gebiet betreffen, das mir fernliegt, der Freundlichkeit des Vorstehers der staatlichen Anstalt zur Untersuchung von Nahrungs- und Genußmitteln für den Landespolizeibezirk Berlin, Herrn Prof. Dr. Juckenack.

¹⁾ Ein Artikel, in welchem die Technik der Methode besprochen wird, erscheint in der „Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel“.

verdrängen oder sich auch nur Gleichberechtigung zu verschaffen.

Die Frage, ob es möglich ist, mit Hilfe der Präzipitinreaktion Eiweißsubstanzen quantitativ zu bestimmen, ist im Prinzip seit Jahren bereits entschieden, und zwar in bejahendem Sinne. Der erste, der ihr näher trat, war Nuttall. Aus der Menge des Präzipitats, die er mit Hilfe eines besonders konstruierten Apparats möglichst exakt bestimmte, ermittelte er die Menge der präzipitinbindenden Eiweißstoffe. Er benutzte seine Methode, die später noch verbessert wurde (Nuttall und Inchley), zur Bestimmung der Verwandtschaftsgrade der verschiedenen Tierspezies. Nach Graham-Smith und Sanger ist sie auch dann am Platze, wenn es gilt, die Wirkungen des Alters, der Fäulnis und chemischer Reagentien auf Sera und Antisera zu prüfen. Noch in demselben Jahre (1902) gab ich eine zweite Methode an für den quantitativen Nachweis von Blut, die ich zunächst nur kurz skizzierte (1). Nachdem ich sie später unter verschiedenen äußeren Bedingungen experimentell erprobt hatte, habe ich über sie auf der 76. Naturforscher- und Aerzteversammlung in Breslau (September 1904) und in einer Arbeit vom Januar 1905 (2) ausführlicher berichtet. Ich sagte dort folgendes:

Legt man in bestimmter Progression Blutverdünnungen an, so zeigen die nach Zusatz des Antiserums und Umschütteln der Mischung entstandenen Präzipitate regelmäßige Abstufungen. Eine Verdünnung von stärkerer Konzentration weist stets eine stärkere Trübung auf als eine von schwächerer Konzentration.¹⁾ Die Intensität der spezifischen Trübungen fällt nach dem jeweiligen Grad der Blutverdünnung aus und ist diesem genau angepaßt. Es liegt in diesem Parallelismus ein gesetzmäßiges Verhalten. Eine zweite in Betracht kommende Eigenschaft ist die, daß der zeitliche Ablauf der Trübungen sich ebenfalls nach bestimmten Gesetzen vollzieht. Legt man eine beliebige Anzahl gleicher Verdünnungsreihen von Blut, bzw. Serum an und setzt man zu den einzelnen Verdünnungen überall die gleiche Menge desselben spezifischen Antiserums, so läßt sich beobachten, daß zeitlich das Auftreten der Trübungen in den Verdünnungen gleicher Konzentration überall zusammenfällt. Wenn z. B., vom Moment des Antiserumzusatzes an gerechnet, in einer Verdünnung der Reihe 1, sagen wir in der Verdünnung 1:1000, die erste Präzipitatbildung nach fünf Minuten beginnt, so ist dies auch der Fall bei den Verdünnungen 1:1000 aller anderen Reihen. In der schwächeren Verdünnung tritt die Trübung stets später ein als in der stärkeren; bildet sich die Trübung in jener sofort nach Zusatz des Antiserums, dann ist dasselbe auch bei der stärkeren Verdünnung der Fall.

Diese beiden Eigenschaften der Präzipitinreaktion sind das Fundament, auf dem das Prinzip der quantitativen Bestimmung von Blut und das Prinzip der quantitativen Bestimmung aller Eiweißsubstanzen überhaupt, so weit sie imstande sind, Präzipitine zu erzeugen, sich aufbaut. Sie bürgen dafür, daß die einzelnen Phasen im Ablauf der Reaktion stets die gleichen sind. Es ist hierbei vorausgesetzt, daß man die Reaktion immer unter gleichen äußeren Bedingungen ablaufen läßt. Wollte man die eine Verdünnungsreihe in eine höhere Temperatur bringen als die andere, so kämen allerdings Ungleichheiten zustande, da höhere Temperaturen den Eintritt der Präzipitinreaktion beschleunigen und niedrige ihn verlangsamen (v. Horn). Ich beobachtete den Ablauf der Reaktion stets bei Zimmertemperatur. Wie ich im übrigen vorging, will ich hier nur kurz erwähnen. Es wurde zuerst die Wertigkeit des Antiserums genau ermittelt, d. h. festgestellt, welche Verdünnung der homologen Blutlösung innerhalb 30 Minuten nach seinem Zusatz zuletzt sich trübte. Zur Auslaugung des der Menge nach zu bestimmenden Blutes (x) wurde 0,6%ige Kochsalzlösung genommen, deren Menge (k) bekannt war. Von der Auslaugungsflüssigkeit, in

der die zu ermittelnde Blutmenge $\frac{x}{k}$ betrug, wurden Verdünnungen in bestimmter Progression angelegt. Diejenige, die nach Zusatz des Antiserums innerhalb 30 Minuten zuletzt sich trübte, hatte dann dieselbe Konzentration wie jene, nach der die Wertigkeit des Antiserums berechnet war. Nehmen wir an, in einem bestimmten Falle trübte sich diejenige Verdünnung zuletzt, in welcher die Menge des Blutes $\frac{x}{100k}$ betrug. Es deckten sich dann $\frac{x}{100k}$

¹⁾ Ein Ueberschuß an präzipitabler Substanz, also eine sehr starke Konzentration der homologen Eiweißlösung, beeinträchtigt die Bildung des Präzipitats. Für diesen Fall erleidet jene Regel eine Ausnahme, doch kommen für obige Methode stets nur die Verdünnungen geringster Konzentration in Betracht, bei denen eine Abweichung der Regel nicht besteht.

und diejenige Zahl, die die Wertigkeit des Antiserums ausdrückte (z. B. $\frac{1}{8000}$). Danach ließ sich x, die Menge des Blutes, berechnen.

Nach mir hat Ottolenghi (2) 1903 ein Verfahren angegeben, das, so viel man aus den kurzen Angaben darüber entnehmen kann, mit meinem Verfahren identisch ist. Er versuchte es an Eigelb in Eiernudeln, dürfte also der erste gewesen sein, der die Methode zu speziellen Zwecken der Nahrungsmittelchemie anwandte.

Noch bevor ich von dieser Arbeit Ottolenghis Kenntnis hatte, war ich daran gegangen, die von mir zunächst für den quantitativen Nachweis von Blut ersonnene Methode auch für die Nahrungsmittelchemie nutzbar zu machen. Dieser Gedanke lag für mich um so näher, als ich schon in der Arbeit über den Blutnachweis auf den großen Vorzug dieser vor den übrigen Methoden des quantitativen Blutnachweises hingewiesen hatte, der darin bestand, daß das biologische Verfahren vermöge seiner Spezifität gestattet, ein bestimmtes Blut auch in einem Gemisch verschiedener Blutarten quantitativ zu ermitteln. Von diesem Ideengange zu dem Plan, mit Hilfe der Präzipitinreaktion auch Eiweißstoffe in anderen Gemischen, wie sie uns in der Nahrungsmittelchemie begegnen, quantitativ zu bestimmen, war nur ein kurzer Sprung. Als Versuchsmaterial hatte ich Pferdefleisch und Hühnereigelb gewählt. Das Pferdefleisch, das wegen seiner Minderwertigkeit oft zu Verfälschungen von Fleisch- und Wurstwaren benutzt wird, versuchte ich in Hackfleisch quantitativ zu bestimmen, das Eigelb, das in Nahrungs- und Genußmitteln häufig ganz oder teilweise durch Farbstoffe, wie Saffran, Curcuma und gelbe Teerfarbstoffe, vorgetäuscht wird, in Eiernudeln und Eierkognak.

Versuche mit Pferdefleisch.

Zunächst galt es, festzustellen, wie sich am wirksamsten die Eiweißstoffe, deren Menge ich nachweisen wollte, extrahieren ließen und in welcher Weise der Auszug behufs Anstellung der Reaktion am schonendsten von allen Verunreinigungen, namentlich bakterieller Art, befreit werden konnte. Es sei über die vielen Versuche, die zu diesem Zweck angestellt wurden, nur kurz berichtet.

Das stets frisch und in einem Stück bezogene Fleisch wurde in einer Maschine fein zermahlen und 10 g davon mit 50 ccm 0,6%iger Kochsalzlösung versetzt. Bei Zimmertemperatur blieb das Ganze über Nacht (18–20 Stunden) stehen. Gleiche Mischungen unter Zusatz von Chloroform (10 Tropfen), Karbol (0,5:100) und Formalin (1:5000) wurden ebenso behandelt. Die Versuche wurden im Brutschrank bei 36° wiederholt. Es zeigte sich, daß ein wesentlicher Unterschied in der Extraktionskraft der einfachen und der chloroformhaltigen Lösung bei Zimmer- oder Brutschranktemperatur nicht bestand. Uhlenhuth (3) hat angegeben, daß Zusatz einiger Tropfen Chloroform die Lösung der Eiweißstoffe im Fleisch beschleunige. Während der 18–20 Stunden, die die Mischung stand, hatte in meinen Versuchen die einfache Kochsalzlösung ebensoviel gelöst wie die chloroformhaltige. In der keimtötenden Kraft erwiesen sich alle Mittel als unsicher; zwar beeinträchtigten sie die Extraktion der Eiweißstoffe nicht, sie brachten aber auch keine sonderlichen Vorteile. Das Einfachste war noch das Beste: die Anwendung einer zusatzfreien Kochsalzlösung und die Aufbewahrung bei Zimmertemperatur. Die unerläßliche Klarheit des Fleischauszuges erreichte ich nach mehrfachen Versuchen anderer Art schließlich mit Hilfe geglühten Kieselguhrs, durch das ich in einem Fließpapierfilter den vorerst durch Zentrifugieren von groben Bestandteilen gereinigten Fleischauszug hindurchschickte. Nach ein- oder zweimaligem Filtrieren war der Auszug gewöhnlich vollkommen blank.

Die Methode konnte nur dann quantitativ arbeiten, wenn stets die Gesamtheit der Eiweißstoffe extrahiert wurde. Um mir hierüber Gewißheit zu verschaffen, verfuhr ich in folgender Weise. Ich nahm zu 50 ccm Kochsalzlösung einmal 1 g Pferdefleisch, dann 5 g, 10 g, 20 g, 30 und 40 g, also schließlich so viel, als sich mit der Kochsalzlösung gerade noch gleichmäßig durchmischte, und prüfte nun an diesen verschiedenen Lösungen die Wertigkeit desselben Antiserums. Ueberall entstanden innerhalb 30 Minuten Trübungen bis zur Verdünnung 1 g in 200 ccm. Ob ich also wenig oder viel Fleisch genommen hatte, immer war das Resultat dasselbe. Die Kochsalzlösung extrahierte aus 1 g Pferdefleisch, ob dieses nun allein oder mit 39 anderen zusammen war, stets dieselbe

Menge Eiweiß. Dieses ließ sich nur dahin deuten, daß überall die gesamten Eiweißstoffe in Lösung gegangen waren.

Schließlich war noch ein Punkt zu erledigen. Wir kennen heute noch kein Präzipitinserum, das absolut spezifisch wäre. Jedes Antiserum gibt unter gewissen Umständen auch mit fremden Eiweißstoffen Niederschläge. Da bei der mir gestellten Aufgabe, bei der in einem Gemenge verschiedener Fleischarten eine bestimmte quantitativ zu ermitteln war, die Eiweißstoffe der heterologen Fleischarten oft recht konzentriert sind, waren die Bedingungen zum Auftreten jener „heterologen“ Trübungen gegeben. In mehreren meiner Versuche erhielt ich denn tatsächlich auch zu große Pferdefleischmengen. Man kann sich vor solchen unliebsamen Ueberraschungen dadurch schützen, daß man auf dem Wege der „elektiven Absättigung“ sich streng spezifische Partialpräzipitine herstellt (vergl. Ascoli, Weichardt u. a.), oder man verdünnt, indem man eine entsprechende Menge Kochsalzlösung zum Extrahieren des Fleisches anwendet, den Eiweißauszug bis zu einer Grenze, bei der erwiesenermaßen heterologe Trübungen nicht mehr auftreten. Ich wählte das zweite Verfahren, das wegen der stärkeren Verdünnung des Eiweißes zugleich den Vorzug hat, daß der Ablauf der Präzipitinreaktion ungestört bleibt, da heterologes Eiweiß in starker Konzentration ebenso wie ein Ueberschuß an präzipitabler Substanz die Reaktion beeinträchtigt.

Die ersten Versuche stellte ich an Gemengen von Pferdefleisch und Rind-, bzw. Schweinefleisch an, die ich mir selbst abwog. Es gelang stets, die ganze Pferdefleischmenge zu erhalten, sodaß ich bald zu den entscheidenden Versuchen übergehen konnte, für die mein Mitarbeiter an der Unterrichtsanstalt, Herr Dr. Marx, die Abwägung des Pferdefleisches übernahm. Jetzt erst begannen die eigentlichen Schwierigkeiten, die in der Ermittlung der „letzten“ Trübung lagen. So lange ich das Fleisch mir selbst abwog, wie auch bei den früheren Versuchen mit Blut, konnten die ganzen Anordnungen des Versuches, die zu ermittelnde Blut-, bzw. Pferdefleischmenge, die Menge der zugesetzten Kochsalzlösung, die Konzentration der Verdünnungen, auf ein volles Gelingen stets zugeschnitten werden. Da ich im Voraus berechnen konnte, auf welche Verdünnung die letzte Trübung fallen werde, machte ihre Erkennung keine Schwierigkeiten. Legte ich die Verdünnung, wie es geschah, in weiten Abständen an, so wurde dieses Herausfinden noch erleichtert. Bei den jetzigen Versuchen lagen die Dinge anders. Hier ließen sich, da mir die Pferdefleischmengen unbekannt waren, die einzelnen Faktoren nicht zueinander abpassen. Wollte ich so genaue Resultate erzielen wie früher, so war dieses nur dadurch zu erreichen, daß die Verdünnungen, die aus dem Fleischauszuge hergestellt wurden, in engen Abständen angelegt wurden. Daraus ergaben sich aber neue Schwierigkeiten. Die Abstufungen in den Trübungen fielen jetzt so minimal aus, und der Uebergang von trüben zu klaren Verdünnungen wurde ein so allmählicher, daß jede Sicherheit im Erkennen der letzten Trübung verloren ging. Unter Verzichtleistung auf stets volle Uebereinstimmung zwischen berechneter und wirklicher Fleischmenge kehrte ich also zu weiten Abständen zurück. Der dadurch bedingte Nachteil ließ sich einigermaßen dadurch ausgleichen, daß zwei Reihen von Verdünnungen angelegt wurden, deren Konzentrationen so gewählt waren, daß jede Verdünnung der einen Reihe in die Mitte des Abstandes von zwei Verdünnungen der andern Reihe fiel. In jeder Reihe wurde die letzte Trübung bestimmt, was bei den weiten Abständen ohne besondere Schwierigkeit gelang. Diejenige, die dann hier die letzte war, kam für die Berechnung in Betracht. Mit der Einschaltung noch einiger anderer Maßnahmen glaube ich das Verfahren jetzt so weit gefördert zu haben, daß es innerhalb gewisser, nicht erheblicher Fehlergrenzen recht gute Resultate gibt. Das Ergebnis einer Untersuchung sei hier mitgeteilt.

Gesamtgewicht des Fleischgemenges (x g Pferdefleisch + artfremdes Fleisch)	Menge der zugesetzten Kochsalzlösung (K)	Wertigkeit des Antiserums innerhalb 60 Minuten	Letzte Trübung nach 60 Minuten bei	Berechnete Menge des Pferdefleisches	Wirkliche Menge des Pferdefleisches	Fehlergrenze
50,57 g	100 ccm	1:820	x: 160 k	19,5 g	19 g	1 %

Hierzu noch einige Worte. Das artfremde Fleisch stammte von einer menschlichen Leiche. Es ist bekannt, daß nicht jedes Kaninchen ein brauchbares Antiserum liefert. In der ersten Zeit meiner Versuche besaß ich ein Antiserum für Pferdefleischsaft, welches allen Ansprüchen bezüglich seines Verhaltens gegenüber dem Fleischsaft von Rind, Hammel und Schwein genügte; es ließ diesen selbst dann noch ungetrübt, wenn ein Auszug aus 30 g Fleisch mit 50 ccm Kochsalzlösung hergestellt war, also bei einem Verhältnis von 3:5. Bei den späteren Antisera konnte ich das Fleisch jener Tiere nicht mehr verwenden, es gab mit seinen Auszügen noch bis zur Verdünnung 1:50, 1:100 und weiter Niederschläge. Eine größere Zahl von Tieren stand mir leider nicht zur Verfügung, da die Mittel der Unterrichtsanstalt ihre Beschaffung nicht gestattete, und so wählte ich denn das Fleisch menschlicher Leichen, in dessen Auszug nur bei sehr starker Konzentration auf Zusatz der Antisera ein Niederschlag auftrat. Die Beobachtungszeit zur Bestimmung der letzten Trübung hatte ich nach Aufnahme der entscheidenden Versuche bald auf 60 Minuten ausgedehnt; es erwies sich mir vorteilhaft, an diesen Teil meiner Aufgabe, von dem der Erfolg in erster Linie abhängt, mit möglichst viel Muße herangehen zu können. Die Fehlergrenze von 1 % ist gering zu nennen, sie betrug in anderen Versuchen mehr, 2 auch 3 %. Viel höher könnte die Abweichung, wenn die Untersuchung sonst richtig ausgeführt ist, wohl nicht sein, doch müßten hierüber erst weitere Versuche Aufschluß geben.

Bei meinen früheren Versuchen mit Blut hatte ich zeigen können, daß es bei einer Aufbewahrung unter Bedingungen, die es vor Fäulnis schützen — Aufsaugen durch Leinwand oder Fließpapier und Eintrocknenlassen — noch lange in ganzer Menge nachweisfähig erhalten wird. Dasselbe gilt auch für Fleisch. Ich mischte 10 g Pferdefleisch mit 20 g Rindfleisch, breitete die Mischung auf Fließpapier aus und setzte sie für acht Tage dem Sonnenlichte frei aus. Sie war hart und vollkommen trocken geworden, außen von brauner, innen braungrauer Farbe. Mit dem Fließpapier, auf dem sie lag, wurde sie dann mittels Schere zerkleinert und ausgelaut. Es zeigte sich, daß eine Einbuße an präzipitinbindenden Eiweißsubstanzen nicht eingetreten war. Dieser Umstand eröffnet der Präzipitinreaktion bei quantitativen Eiweißbestimmungen neue Perspektiven. Es wird nicht immer möglich sein, eine Untersuchung sogleich vorzunehmen, es könnte in diesem oder jenem Falle überhaupt sich als vorteilhafter herausstellen, die Untersuchung erst am eingetrockneten Stoffe vorzunehmen, und dazu bietet die Präzipitinreaktion also leicht die Hand.

Die Eiweißstoffe des Pferdefleisches und der übrigen hier in Anwendung gezogenen Fleischarten stehen sich als artfremde gegenüber. Man läuft keine Gefahr, unter Beobachtung der genannten Vorsichtsmaßregeln durch die Präzipitinreaktion zu falschen Schlüssen geleitet zu werden. Ein Irrtum wäre allerdings bei einer andern Fleischart möglich. Das Pferd ist dem Esel artverwandt, das Antiserum, das durch Einverleibung von Pferdeserum erhalten wird, wirkt, wie Uhlenhuth (3) zuerst bewiesen hat, präzipitierend auch auf Eselfleischsaft, wenn auch schwächer. Eine Trübung, die auf Zusatz eines für Pferdefleischsaft spezifischen Antiserums in einem Fleischauszuge auftritt, beweist also noch nicht, daß wirklich Pferdefleisch vorliegt; es kann auch Eselfleisch oder dieses und Pferdefleisch anwesend sein. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Nachweis anderer Fleischsorten. Beim Rindfleisch kommt z. B. das Fleisch der artverwandten Ziege und des Hammels in Betracht. Dieser Möglichkeit wäre in einem gerichtlichen Falle stets zu gedenken. Ob sie de facto in Frage kommt, ist eine Frage für sich. Hier spielen die Preise der einzelnen Fleischsorten und andere Momente eine Rolle.

Strauch hat sich unlängst mit dieser durch die Verwandtschaftsreaktion geschaffenen Komplikation von dem Standpunkt des Gerichtsarztes befaßt; er rät, beim forensischen Nachweis von Menschenblut dem Gutachten folgende Fassung zu geben: es liegt Menschenblut vor, wenn Affenblut ausgeschlossen ist. Eine ähnliche Form des Gutachtens dürfte sich auch für andere Fälle empfehlen. — Der Sachverständige wäre übrigens der Notwendigkeit, sein Gutachten unter Umständen

selbst abschwächen zu müssen, enthoben, wenn Uhlenhuths (6) „kreuzweise Immunisierung“ die in sie gesetzten Erwartungen erfüllen sollte. Es ist ihm gelungen, bei verwandten Tieren durch gegenseitige Einspritzungen ihres Blutes streng spezifische Präzipitine zu erzeugen, mit denen er das Blut von Huhn—Tauben, Hase—Kaninchen, Mensch—Affe vollkommen auseinanderhalten konnte.

Versuche mit Hühnereigelb.

Bei den bisherigen Versuchen handelte es sich um Eiweißkörper verschiedener Tierspezies, bei denen eine Unterscheidung, wenn wir von der Verwandtschaftsreaktion absehen, im allgemeinen leicht auszuführen ist. Bei dem Material, dem wir uns jetzt zuwenden wollen, steht die Trennung von Eiweißkörpern eines und desselben Tieres in Frage.

Der Erste, der den Nachweis führte, daß dieses möglich sei, war Hamburger, der Antisera für Albumin und Casein der Kuhmilch darstellte. Das eine erzeugte nur in Albuminlösungen, das andere nur in Caseinlösungen eine Trübung. Ottolenghi (1 u. 2), Schütze (2) und Uhlenhuth (5) schieden biologisch das Eiklar vom Eigelb des Hühnereies und Uhlenhuth (5) die Eiweißstoffe der Linse von denen des Glaskörpers und der anderen Organe des Rindes. Die Antisera Hamburgers gaben allerdings auch eine Reaktion in Rinderblutlösung. Das Linsenantiserum Uhlenhuths war im Gegensatz zu allen bisher bekannten biologischen Gesetzen nicht imstande, das Linseneiweiß der Säugetiere, Vögel und Amphibien, also in der zoologischen Reihe weit auseinander stehender Klassen, zu unterscheiden. Das Antiserum für Hühnereigelb erzeugte eine Verwandtschaftsreaktion auch in Enten- und Gänse-dotter und eine schwächere in Taubendotter, gab aber auch eine Trübung in Hühnerblutlösung und den Blutlösungen der anderen Vögel.

In letzter Zeit haben sich für die Trennung von Eiweißkörpern desselben Individuums aus der Spezifität der Funktion der einzelnen Zellen weitere Ausblicke ergeben. Es unterscheiden sich die Zellen der hochorganisierten Lebewesen, z. B. die Zellen des Menschen und des Rindes, nicht bloß nach ihrer Art, sondern die Zellen einer und derselben Art und eines und desselben Lebewesens auch nach ihrer Funktion. Es gibt Zellen, die nur der Atmung dienen, andere, die nur die Nahrungsaufnahme, dritte, die nur die Fortpflanzung besorgen etc. So verschieden nun, wie die Funktion dieser Zellen ist, ist auch ihr Eiweiß. Folgerichtig mußte innerhalb des weiten Begriffes der Artspezifität ein zweites Gesetz bestehen: das Gesetz der Spezifität der Funktion (vgl. auch Pfeiffer). Soweit man Zellenmaterialien rein darstellen konnte, hat man auch bereits Ergebnisse erzielt, die das Bestehen jenes Gesetzes tatsächlich beweisen. So hat Grund organspezifische Präzipitine erzeugt, mit denen die Trennung von Blut und Organen desselben Individuums stets leicht gelang, von Organen unter sich allerdings nur teilweise und weniger leicht. Vor Grund hatte Forssner schon ähnliche Versuche angestellt. Daß diese Bestrebungen, die Eiweißsubstanzen desselben Tierkörpers zu trennen, nicht ohne Bedeutung auch für die Nahrungsmittelchemie sind, ist einleuchtend.

Das Eidotter, das ich für meine Versuche wählte, findet in der Industrie zur Herstellung von Nahrungs- und Genußmitteln die ausgedehnteste Verwendung. Ein Antiserum, das möglichst nur auf dieses, so gut wie garnicht auf Eiklar reagierte, konnte nur dann erhalten werden, wenn das Eidotter ganz rein gewonnen wurde.

Ich isolierte es nach dem Vorgange von Uhlenhuth (5) dadurch, daß ich es nach Abgießen des Eiklars in ein mit flüssiger Gelatine gefülltes Glas tat. Nachdem die Gelatine erstarrt war, wurde die Decke teilweise abgetragen und nun das Dotter entleert. Dotterhaut und Rest des Eiklars blieben in der Gelatine zurück. Das Dotter wurde, mit etwas Kochsalzlösung angerührt, den Tieren intraperitoneal einverleibt. Das aus fünf Injektionen gewonnene Antiserum war so hochwertig, daß es Dotterlösungen innerhalb 60 Minuten bis zur Verdünnung 1:30 000 trübte. Bei dieser Verdünnung und schon lange vorher — von etwa 1:8000 an — waren die Lösungen vollständig klar, sodaß jede Trübung erkannt werden konnte. Eiklarlösungen ließ es in der Konzentration 1:100 noch nach 24 Stunden vollständig klar, nur in der Verdünnung 1:10 rief es nach etwa 30 Minuten eine schwache Trübung hervor, die später noch deutlicher wurde, ohne daß sich aber Flocken absetzten.

Die Spezifität ging also außerordentlich weit, was auch bei Uhlenhuths Antisera der Fall war.

Ich versuchte, das Eigelb in Eiernudeln und Eierkognak quantitativ zu bestimmen.

Die Nudeln wurden aus Weizenmehl und 45 g Eigelb hergestellt, die unter bloßem Zusatz von Wasser zu einem gleichmäßigen Teige angerührt wurden. Nach zehnwöchigem Stehen betrug das Gewicht genau 500 g, sodaß auf 1 g Nudeln 0,09 g Eigelb kamen. Zum Eierkognak wurden 25 g Eigelb genommen, die in einer tarierten Reibeschale zuerst mit einem Sirup von 30 g Zucker auf 20 g destilliertes Wasser, sodann mit 35 ccm 50 Vol. % Alkohol unter allmählichem Zusatz innig verrührt wurden, bis das Ganze eine homogene Masse darstellte. Sein Gewicht, welches mehr als 100 g betrug, wurde durch Zusatz von destilliertem Wasser auf 125 g erhöht, sodaß auf 5 g Eierkognak 1 g Eigelb kam. Die Menge betrug 114 ccm. Der Eierkognak entsprach damit in der Menge seiner hauptsächlichsten Bestandteile dem käuflichen Eierkognak, dessen Zusammensetzung ähnliche Zahlen aufweist. Nachdem eine Probe an vier Eiern aus verschiedenen Ställen ergeben hatte, daß in jedem Gramm Dotter, gleichviel aus welchem Ei es stammte, die gleiche Menge präzipitinbindender Eiweißkörper enthalten war — die Proben ergaben mit demselben Antiserum stets dieselbe Wertigkeit —, nachdem hierdurch also, soweit der Ausfall von vier Proben einen Schluß gestattet, der Beweis erbracht war, daß die Beschaffenheit des Eies, seine Herkunft, Größe etc., ohne Einfluß auf den Ausfall der Reaktion war, konnte in die Versuche eingetreten werden.

Es war nötig gewesen, jenes erst festzustellen, da andernfalls, wenn die Eidotter wechselnde Mengen präzipitinbindender Eiweißgruppen enthielten, ungenaue Resultate die Folge waren. Ähnliche Untersuchungen hatte ich übrigens schon bei den quantitativen Blutbestimmungen gemacht, wo ich das Blut verschiedener Individuen (Leichen) auf seinen Gehalt an spezifischen Stoffen prüfte.

Die Eiernudeln, mit denen die Reihe der Versuche begann, wurden in einer Reibeschale fein verrieben. Eine bestimmte Menge wurde abgewogen, mit etwas Kochsalzlösung unter allmählichem Zusatz zu einem innigen Brei vermischt, alsdann der Rest der abgemessenen Kochsalzlösung zugesetzt. Das Ganze blieb für 18 bis 20 Stunden bei Zimmertemperatur in einem Kolben stehen. Die Menge der Kochsalzlösung betrug stets 100 ccm, die der Eiernudeln wurde variiert und schwankte zwischen 1 und 8 g. Die Extraktionsflüssigkeit wurde mit Kieselguhr bis zur Klarheit filtriert.

Wie bei den Versuchen mit Pferdefleisch sollte auch hier zunächst ermittelt werden, ob aus jedem einzelnen Gramm Nudeln stets dieselbe Menge Eiweißstoffe extrahiert wurde. Das war, wie sich sofort ergab, nicht der Fall; die Resultate fielen verschieden aus, die Unterschiede waren allerdings nur gering. Es ließ sich weiter feststellen, daß auch das Alter der Eiernudeln nicht ohne Einfluß auf den Ausfall der Versuche war. Die zuerst untersuchten hatten ein Alter von zehn Wochen, die zuletzt untersuchten ein solches von 17 Wochen. Die Werte wurden mit zunehmendem Alter immer kleiner. Hiervon aber ganz abgesehen, betrug die ermittelte Menge von vornherein nur einen Bruchteil der wirklichen. Es wurden im günstigsten Falle 0,0133 g Eigelb aus 1 g Nudeln erhalten, etwa der siebente Teil der ursprünglichen Menge, im letzten Versuch gar nur 0,0033 g, also bloß noch der 27. Teil. Ottolenghi (2), der, wie schon erwähnt, bereits Versuche mit Eiernudeln angestellt hat, erhielt ebenfalls nur einen Teil, etwa die Hälfte des Eigelbes wieder. Er maß die Schuld dem mangelnden Extraktionsvermögen der Kochsalzlösung zu. Ich nahm deshalb zur Auslaugung in neuen Versuchen destilliertes Wasser, das ich nachher mit „doppelter“ Kochsalzlösung zu gleichen Teilen versetzte. Der Erfolg war derselbe. Das Verfahren, das bei Fleisch die besten Resultate gegeben hatte, versagte also hier.

Wenn dieses Fehlschlagen in Wirklichkeit damit zusammenhing, daß ein Teil des Eigelb ungelöst in den zerriebenen Eiernudeln zurückblieb, so waren von Eierkognak, zu dessen Untersuchung ich nunmehr überging, zutreffende Resultate zu erwarten, da das Eigelb hier schon gelöst war. Eine Prüfung, die ich am dritten Tage nach der Herstellung des Kognaks vornahm, fiel auch positiv aus. Als ich sie aber 14 Tage nach der Herstellung wiederholte, erhielt ich nur noch $\frac{13}{16}$ der Eigelbmenge, also nur noch etwas mehr als $\frac{3}{4}$ des ursprünglichen Gehaltes. Eierkognak verhielt sich demnach ähnlich

wie Eiernudeln; das Verfahren war auch hier nicht anwendbar.

Nur an dem Beispiel des Pferdeleisches konnte vorläufig also bewiesen werden, daß die Nahrungsmittelchemie in der Präzipitinreaktion nicht nur eine vortreffliche Methode zum qualitativen Nachweis von Eiweißsubstanzen besitzt, sondern auch ein Mittel zu ihrer quantitativen Bestimmung. Warum hat die Methode nun bei den Versuchen mit Eigelb versagt? Ottolenghi ist der Ansicht, daß das Eidotter in den Eiernudeln deshalb sich zu einem Teil dem Nachweis entzieht, weil es sich nicht vollständig löst. Meine Versuche haben aber ergeben, daß auch bei Eierkognak, trotzdem hier das Eigelb gelöst ist, von einem gewissen Zeitpunkt an das Eidotter nicht mehr in ganzer Menge aufzufinden ist. Die Ursache für das Versagen dieser Methode müssen wir also an anderer Stelle suchen. Es war dem Eierkognak und den Eiernudeln in obigen Versuchen das gemeinsam, daß mit dem Alter die Zahl der nachweisbaren Eiweißkörper geringer wurde. Die Möglichkeit, daß das Antiserum mit der Zeit an Wirkung einbüßte und damit eine Abnahme der ausfällbaren Eiweißkörper vorgetäuscht wurde, schied aus. Seine Wertigkeit wurde jedesmal an frischem Eigelb neu ermittelt. Somit konnte die Ursache, da die Präzipitine nicht in Frage kamen, nur bei der präzipitablen Substanz selbst liegen, d. h. bei den Eiweißkörpern des Dotters. Diese gingen also Veränderungen ein, durch die ihre Affinität zu den spezifischen Substanzen des Antiserums mehr und mehr verloren ging. Ueber die Natur dieser Veränderungen können wir wohl nicht im Unklaren sein. Sie sind offenbar bedingt durch Umsetzungen im Eiweißmolekül. Ueber die Zusammensetzung des Eiweißmoleküls sind wir durch die Forschungen von Drechsel, Kossel, E. Fischer, Hammersten, Salkowski, Hofmeister jetzt fast vollständig unterrichtet. (Schilling, Blumental, Neuberg u. a.) Das Eiweißmolekül baut sich danach in der Weise auf, daß um einen Grundstock zahlreiche Gruppen angeordnet sind. Nach der Art der Anordnungen entstehen die mannigfaltigsten Körper. Einige Gruppen sind so locker angefügt, daß schon geringe Anlässe, wie die Einwirkung hydrolytischer Fermente, genügen, sie abzuspalten. Aus komplizierten Eiweißkörpern bilden sich durch diese Abspaltungen einfachere. Während wir über die Zwischenprodukte des weiteren Zerfalls noch ungenügend unterrichtet sind, sind uns die Endprodukte im Abbau des Eiweißmoleküls, die teils N-haltige Substanzen, wie Harnstoff, Ammoniak, darstellen, teils Fette, Kohlehydrate etc., wohl bekannt. Eine Aufspaltung des Moleküls tritt offenbar nun auch im Eidotter ein, dessen Vitellinverbindungen Körper darstellen, die noch komplizierter als Globulin und Albumin sind. Je mehr Moleküle sich zerlegen, umso geringer wird auch die Zahl der Eiweißgruppen, welche die Präzipitine des Antiserums binden, und um so spärlicher die Präzipitate.

Die Mißerfolge waren also schließlich dadurch herbeigeführt, daß die Versuche mit einem untauglichen Mittel unternommen waren. Das untaugliche Mittel war das Antiserum, das eine Wirkung nur auf die Komponenten des genuine Eidotters, des „Voll Dotters“, äußerte, durch dessen Einverleibung es gewonnen war, das für seine Abbauprodukte aber nicht mehr spezifisch war. War dieses die Ursache, so lag es nahe, einmal festzustellen, ob und inwieweit sich ein Antiserum mit Abbauprodukten herstellen ließ. Von gewissen Spaltungsprodukten des Eiweißmoleküls, z. B. dem Pepton (Myers, Sacconaghi), ist es bekannt, daß sie Antikörper erzeugen können. Ich erinnere auch an die interessanten Versuche von Obermayer und Pick (1 und 2) und Michaelis. Es gelang diesen Autoren, mit ein und demselben Serum verschiedene Antisera zu erzeugen, so für gekochtes aber nicht koagulierte Blutserum, für seine tryptischen Spaltungsprodukte, für ein mit Pepsinsalzsäure angesäuertes Serum, — sobald die immunisierende Substanz eben denselben Zustandsänderungen unterworfen war. Ein Normalantiserum, also ein Antiserum, das durch unverändertes, frisches Serum, durch ein „Vollserum“, gewonnen war, ergab in allen jenen Fällen keinen Niederschlag. Das für gekochtes Serum etc. spezifische Antiserum wirkte gleichzeitig auch präzipitierend auf frisches Serum ein; es besaß also eine über das Gewöhnliche hinausgehende „Reaktions-

breite“. Diese konnten Obermayer und Pick¹⁾ noch beliebig erweitern. So erzeugten sie Immunsere, die imstande waren, nicht allein auf frisches Rinderserum, sondern auch auf gekochtes Rinderserum, Pepsin-, Trypsin- und Permanganat-Spaltungsprodukte einzuwirken. Die Möglichkeit, ein Immunsereum auch für die Abbauprodukte in unserem Falle zu erhalten, lag danach vor. Voraussetzung war nur, daß der Zerfall der Eiweißkörper die Stufe nicht überschritten hatte, bis zu der eine Bildung von Antikörpern stattfindet.

Ich trat dieser Frage näher, zwar nicht an Eigelb, von dem mir geeignetes Material nicht zur Verfügung stand, aber an altem, in einem Handtuch angetrocknetem, menschlichem Blutserum, das der Menge nach bekannt war. Der Versuch, der übrigens insofern nicht einwandfrei war, als für die Immunisierung der Tiere nicht gleiches Material zur Verfügung stand, führte zu einem negativen Ergebnis. Es zeigte sich, daß das durch Immunisierung der Kaninchen mit altem Serum gewonnene Antiserum nicht anders wirkte als das mit Normalserum hergestellte. Es traten bei ihm aber die Trübungen weniger scharf auf, auch ließen die Abstufungen der Trübungen in ihrer Intensität es an der Deutlichkeit fehlen, die man bei einem guten Normalantiserum stets beobachten kann. Daß sich die Verhältnisse bei Eierkognak und Eiernudeln nun ebenso oder ähnlich verhalten, ist damit noch nicht gesagt.

Wollte man hier Versuche anstellen, so wäre übrigens folgendes zu beachten: Impft man Tiere mit Auszügen von Eiernudeln, so verleiht man ihnen gleichzeitig auch die Albumosen des Weizenmehles ein. Das Antiserum enthält dann nicht nur Präzipitine für Eigelb, sondern auch für Weizenmehl. Man könnte den Versuch machen, die störende Wirkung der letzteren durch Antipräzipitine auszuschalten.²⁾ Antipräzipitine sind meines Wissens in der Praxis noch nicht verwertet worden, in der Nahrungsmittelchemie dürften sie die erste Verwendung finden. Bei Eierkognak wäre ferner nach Müller damit zu rechnen, daß der gleichzeitig verimpfte Alkohol die Produktion der Antikörper beeinträchtigt. Vielleicht ließe sich eine solche ungünstige Wirkung des Alkohols durch intraveuöse Hetolinjektionen ausgleichen, die nach demselben Autor gegensätzlich zu Alkohol wirken.

Allgemein oder auch nur in ausgedehnterem Maße ist die quantitative Eiweißbestimmung mit Hilfe der Präzipitinreaktion im Dienste der Nahrungsmittelchemie noch nicht anwendbar. Eine häufige Verfälschung wird z. B. auch bei Wurstwaren durch unerlaubte Verwendung von Pferdeleisch geübt. Hier versagt die Methode ebenfalls, sobald in den Waren durch Kochen das Eiweiß geronnen ist. Bei geräucherten Fleischwaren könnte sie eher zum Ziele führen, wenn nicht mit Hilfe eines Normalantiserums, so vielleicht mit einem Antiserum, das mit dem Saft von Räucherwaren hergestellt ist. Jedenfalls hat die Nahrungsmittelchemie ein begreifliches Interesse daran, diese Methode der quantitativen Eiweißbestimmung für möglichst viele Gebiete nutzbar zu machen.

Bei den zuletzt erwähnten Versuchen wurden zwei Beobachtungen von allgemeinem Interesse gemacht, die hier noch mitgeteilt seien. Uhlenhuth hat 1897 (1) darauf hingewiesen, daß das normale Blutserum des Menschen, Hammels etc. an Kaninchen bei subcutaner Injektion größerer Dosen Nekrose erzeugt. Bei obigen Versuchen trat dasselbe ein bei intravenöser Injektion eines Auszuges von altem Blut. Ich verimpfte einen Extrakt von getrocknetem Leichenblut (aus März 1902), der aus 2 g des gepulverten Blutes mit 20 ccm 0,6 %iger Kochsalzlösung hergestellt war. Bei jedem der geimpften Tiere (4) stellte sich nach der ersten Injektion von 1 ccm des Extrakts eine zehnpennigstückgroße Nekrose am Rande des Ohres in der Umgebung der Einstichstelle ein. Die folgenden, täglich vorgenommenen Injektionen wurden gut vertragen. Die zweite Beobachtung war insofern von Bedeutung, als sie zeigte, daß trotz Anwesenheit von homologem Blute, selbst wenn dieses vor Fäulnis und vor der Einwirkung von chemischen Agentien geschützt war, der biologische Nachweis unter Umständen negativ ausfallen kann. Der Serumfleck in einem

1) Man vergleiche hierzu auch ihre Arbeit in Wiener klinische Wochenschrift 1906, No. 12, S. 327.

2) Eine Herstellung von Antipräzipitinen für Pflanzeneiweißpräzipitine ist meines Wissens allerdings noch nicht versucht worden. Mit Serumpräzipitinen hat man sie darstellen können, mit Bakterienpräzipitinen nicht.

Handtuch, den ich untersuchte, war am 23. Juli 1902 mit 1 ccm frischen Serums angelegt worden. Das Handtuch hing seit jenem Tage im Sammlungszimmer der Unterrichtsanstalt, in unmittelbarer Nähe des Fensters an einem Schrank, dem Lichte frei ausgesetzt. Andere gleiche Flecke von demselben Tage waren schon früher untersucht worden. Nach acht Monaten hatte sich noch die ganze Menge nachweisen lassen, nach etwa zwei Jahren noch die Hälfte und jetzt, nach drei Jahren sieben Monaten (Untersuchung am 4. März 1906), nur noch 0,0025 ccm, d. h. $\frac{1}{4} \%$! Wäre nicht ein Antiserum von sehr hoher Wertigkeit (1 : 40 000 in 30 Minuten) verwendet worden, so hätten sich die geringen Mengen, die biologisch noch auffindbar waren, dem Nachweise ganz entzogen. Der Fleck war mit 50 ccm Kochsalzlösung 18 Stunden ausgelaugt worden. In dieser Konzentration wurde durch Kochen und Zusatz von Salpetersäure eine schwache Trübung erzeugt, die noch nicht so stark war wie diejenige, die man mit frischem Serum in der Verdünnung 1 : 1000 erhält. Die Konzentration 1 : 100 blieb bereits klar. Die chemische Untersuchung bestätigte also, daß nur minimale Mengen Eiweiß in Lösung gegangen waren. Jener Versuch lehrte jedenfalls, daß unter den genannten äußeren Umständen verhältnismäßig schnell ein Zeitpunkt eintritt, zu dem ein differentialdiagnostischer Nachweis des Blutes mit Hilfe der Präzipitinmethode mit Schwierigkeiten verknüpft, ja selbst unmöglich sein kann. Es ist übrigens nicht ausgeschlossen, daß nach einer noch längeren Auslaugung des Fleckes das Resultat vielleicht besser geworden wäre. Untersuchungen darüber, wie lange im Einzelfalle auszulaugen ist, liegen aber bisher nicht vor. Es dürfte lohnend sein, dieser Frage im Interesse des forensischen Blutnachweises einmal näherzutreten.

Literatur: 1. Ascoli, Münchener medizinische Wochenschrift 1902, S. 1409. — 2. Bertarelli, Zentralblatt für Bakteriologie 1904, Bd. 11, 2. Abt., S. 8 u. 45. — 3. Blumenthal, Deutsche medizinische Wochenschrift 1903, S. 437. — 4. Forssner, Münchener medizinische Wochenschrift 1903, S. 832. — 5. Graham-Smith und Sanger, Journal of Hygiene 1903, Bd. 3, S. 258. — 6. Gröning, Zeitschrift für Fleisch- und Milchhygiene 1902, S. 1. — 7. Grund, Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, S. 363 (Sitzungsbericht des Naturhistorischen medizinischen Vereins in Heidelberg, Sitzung am 2. Dezember 1905). — 8. Hamburger, Wiener klinische Wochenschrift 1901, S. 1202. — 9. v. Horn, Ueber den Einfluß der Temperatur auf die Präzipitinreaktion. Dissertation. Würzburg 1903. — 10. Jess, Berliner tierärztliche Wochenschrift 1901, S. 613. — 11. Kowarski, Deutsche medizinische Wochenschrift 1901, S. 442. — 12. Michaelis, Zeitschrift für klinische Medizin 1905, Bd. 56, S. 409. — 13. Miessner und Herbst, Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde 1902, Bd. 28. — 14. Müller, Archiv für Hygiene 1904, Bd. 51, S. 365. — 15. Myers, Zentralblatt für Bakteriologie 1900, Bd. 28, S. 237. — 16. Neuberg, Berliner klinische Wochenschrift 1905, S. 1189. — 17. Nötel, Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1902, Bd. 39, S. 373. — 18. Nuttall, British medical Journal 1902, Bd. 1, S. 825. — 19. Nuttall und Inchley, Journal of Hygiene 1904, Bd. 4, S. 201. — 20. Obermayer und Pick, Wiener klinische Wochenschrift 1903, S. 659. — 21. Dieselben, Wiener klinische Wochenschrift 1904, S. 265. — 22. Ottolenghi, Estratto degli Atti della R. Accademia dei Fisiocritici, Siena 1902, Bd. 14, Serie 4. — 23. Derselbe, Estratto dall' Archivio per le Scienze Mediche Torino 1903, Bd. 27. — 24. Pfeiffer, Archiv für Kriminalanthropologie 1906, Bd. 22, S. 244. — 25. v. Rigler, Oesterreichische Chemikerzeitung 1902, No. 5. Zitiert nach Uhlenhuth 39. — 26. Ruppel, Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel 1902, S. 356. — 27. Sacconaghi, Zeitschrift für klinische Medizin 1904, Bd. 51, S. 187. — 28. Schilling, Prager medizinische Wochenschrift 1904, S. 453 u. 469. — 29. Schütze, Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1901, Bd. 38, S. 487. — 30. Derselbe, ebenda 1904, Bd. 47, S. 144. — 31. Schulz, Zeitschrift für Medizinalbeamte 1902, S. 637. — 32. Derselbe, Vierteljahrsschrift für gerichtliche Medizin 1905, S. 1. — 33. Sion und Lapes, Zeitschrift für Fleisch- und Milchhygiene 1902, S. 4. — 34. Strauch, Aerztliche Sachverständigenzeitung 1905, S. 429. — 35. Uhlenhuth, Zeitschrift für Hygiene 1897, Bd. 26, S. 384. — 36. Derselbe, Deutsche medizinische Wochenschrift 1901, S. 82. — 37. Derselbe, ebenda 1901, S. 780. — 38. Derselbe, Greifswalder medizinischer Verein, Sitzung am 6. Dezember 1902. Bericht in der Deutschen medizinischen Wochenschrift 1903, Vereinsbeilage No. 5, S. 39. — 39. Derselbe, Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut etc. Jena 1905, S. 84. Festschrift Rob. Koch. — 40. Derselbe, Deutsche medizinische Wochenschrift 1905, S. 1673. — 41. Wassermann und Schütze, Berliner klinische Wochenschrift 1901, S. 187. — 42. Weichardt, Hygienische Rundschau 1903, No. 15.