

(Aus dem Laboratorium der Psychiatrischen und Nervenklinik der Universität Jena  
[Direktor: Prof. Dr. Hans Berger].)

## Eine neue Modifikation der Bestimmung der Eiweißrelation im Liquor.

Von

Dr. Hermann Stefan.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Januar 1933.)

Je mehr man sich mit der chemischen Analyse des Liquor cerebrospinalis beschäftigte, um so klarer wurde die besondere Bedeutung des qualitativen wie auch insbesondere des quantitativen Nachweises der Eiweißkörper im Liquor, in jener Flüssigkeit, die Gehirn und Rückenmark umspült und erfüllt und die in sehr empfindlicher Weise auf die geringsten Störungen des Zentralnervensystems jeglicher Art mit Veränderungen im Eiweiß-, Chlorid- und Zuckerspiegel reagiert. Wenngleich sich zahlreiche andere Methoden der Liquoruntersuchung eingebürgert haben, so steht dennoch die Eiweißuntersuchung gegenwärtig an erster Stelle.

Von all den vielen Eiweißbestimmungsmethoden, die insbesondere den Psychiater und Neurologen interessieren, hebe ich die quantitative Bestimmung hervor, die in letzter Zeit verschiedene Variationen erlitten hat, die aber infolge der noch allzu komplizierten Apparatur und des etwas umständlichen Darstellungsverfahrens relativ selten vom Kliniker im Laboratorium Anwendung findet.

Überblicken wir die in letzter Zeit veröffentlichten Methoden der quantitativen Bestimmung des Eiweißes im Liquor, so kann man einige Gruppen zusammenfassen, die auf verschiedenen Grundprinzipien basieren. So weisen *Matz* und *Novick* das Eiweiß durch eine Farbreaktion nach, sie bestimmen den Tyrosingehalt des Eiweißes durch Farbmessung der Blaufärbung, die durch Zusatz des *Wuschen Phenolreagenz* zur eiweißhaltigen Flüssigkeit hervorgerufen wird.

Die alte Methode von *Hewitt*, die eine colorimetrische Bestimmung der Eiweißfraktionen auf Grund ihres verschiedenen Tyrosingehaltes darstellt, boten *Matz* und *Novick* die Grundlage für ihre Modifikation.

Die Reihenreaktion von *Takata* und *Ara* nimmt als kolloidchemische Reaktion eine Sonderstellung ein und besteht darin, daß man zu 1 ccm

Liquor einen Tropfen 10%ige Natriumcarbonatlösung und 0,3 ccm einer Mischung gleicher Teile von Sublimat und Fuchsin zusetzt. Normalerweise bleibt nach 12 Stunden eine klare violette Färbung bestehen, beim sog. metaluischem Typus tritt früher oder später Ausflockung auf, beim meningitischen Typus Rotfärbung.

*Lange* bedient sich einer gravimetrischen Methode, indem er die Globuline durch Halbsättigung des Liquors mit Ammoniumsulfat ausfällt, durch Filtration isoliert und dann abwägt; die Albumine werden durch Hinzufügen einer zehnfachen Menge Alkohol zu einem aliquoten Teil des Filtrates ausgefällt, ebenfalls filtriert und dann abgewogen.

*Fanny Halpern* hat die Albumine und die Globuline des Liquors durch Kjeldahlisierung bestimmt; die Globuline wurden durch 22,5%ige Sättigung mit Natriumsulfat ausgesalzen.

*Jakobsthal* und *Joel* fraktionieren und isolieren Globuline und Albumine und bestimmen dann an Hand einer mit 0,9%iger physiologischen Kochsalzlösung angesetzten Verdünnungsreihe mit Hilfe von 10%iger Sulfo-Salicylsäure die Eiweißmengen. Nach einer halben Stunde wurde erst abgelesen, und zwar wurde die letzte Trübung festgestellt. Der Nenner der Verdünnung des betreffenden Röhrchens wurde als zahlenmäßiger Ausdruck für das Vorhandensein des betreffenden Eiweißkörpers betrachtet. Diese Methode der Bestimmung des Eiweißquotienten ist technisch einfach und für das klinische Laboratorium zu empfehlen und ist dem Prinzip nach der von mir zu schildernden Methode ähnlich.

*Kafka* fällt das Gesamtalbumen durch Eßbachreagenz, die Globuline durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat in einem eigens dazu konstruierten und vorher geeichten Röhrchen aus, zentrifugiert unter in Vorversuchen zu bestimmenden Bedingungen, liest die Höhe der Niederschläge in Teilstichen an seinen Röhrchen ab, berücksichtigt den Hydrationszustand der Globuline durch einen ebenfalls in Vorversuchen festzulegenden, mit der Höhe des Niederschlages variablen Devisor; die Albumine berechnet er als Differenz zwischen der Gesamteiweißzahl und der korrigierten Globulinzahl.

Eine ausgezeichnete Kombination des Kjeldahl-Verfahrens mit einer Zentrifugierung des Eiweißniederschlages haben *Zdenko, Stary, Winter-nitz* und *Kral* in allerletzter Zeit angegeben. Es gelingt mit dieser Methode unter Verwendung kleiner Liquormengen Gesamteiweiß, Albumine und Globuline getrennt voneinander mit einer bemerkenswerten Genauigkeit zu bestimmen.

*Goria* verwendet wiederum die qualitativen Reaktionen von *Nonne, Pandy* und *Weichbrodt*, stellt ebenfalls Verdünnungsreihen auf und fällt das Eiweiß mit Trichloressigsäure.

*Jendrassik* und *Krigel* beschrieben in allerletzter Zeit eine gravimetrische Eiweißbestimmungsmethode, die einfach und praktisch ist.

Es handelt sich hierbei um ein Auffangen eines Eiweißpräcipitates auf Barchentfiltern. Leider sind zu einer genauen Wägung 20 ccm Liquor nötig.

Von den stufenphotometrischen Methoden erwähne ich die Methoden von *Gärtner* und *Wolffheim*, die jedoch für klinische Zwecke innerhalb geringer Konzentrationsunterschiede nur nach Eliminierung verschiedener, in der Empfindlichkeit des Instrumentes gelegener Fehlerquellen brauchbar sind.

Es ist nicht meine Absicht, in dieser meiner ersten Mitteilung über eine großangelegte Statistik bei verschiedenen Erkrankungen des Zentralnervensystems zu berichten, sondern ich verfolgte vielmehr den Zweck, eine relativ einfache, auch für den Kliniker im Laboratorium durchführbare Methode zu suchen, die es ermöglicht, ohne komplizierte Apparate und in kurzer Zeit das zahlenmäßige Verhältnis der Globuline zu den Albuminen, i. e. Eiweißquotient, und das Gesamtalbumen mit Hilfe eines Reihenverdünnungsversuches aufzustellen. Angeregt durch die an der III. Medizinischen Klinik in Wien (Vorstand: Prof. Dr. *Chrostek*) angewendete Methode der Gesamtalbumenbestimmung im Liquor nach *Grahe-Machold* versuchte ich, diese Methode nach vorhergehender Fraktionierung und Isolierung der Globuline von den Albuminen in ähnlicher Weise anzuwenden. Es sei gleich an dieser Stelle bemerkt, daß ich mich bemühte, den hierbei entstehenden Eiweißring färberisch darzustellen, und machte mit verschiedenen Farbstoffen zahlreiche Versuche, die aber nie ein recht befriedigendes Ergebnis ergaben. Es sei erwähnt, daß ich mit einem komplizierten Farbstoff, dem Diphenylenamin ( $C_6H_5-NH-C_6H_5$ ), das unter Blaufärbung von Eiweiß resorbiert wird, recht günstige Resultate erzielte. Die Farbversuche sind jedoch nicht abgeschlossen und haben den Zweck, den Eiweißring noch deutlicher sichtbar zu machen und die subjektive Fehlerquelle beim Ablesen des Ringes vollkommen zu beseitigen.

Es ergab sich nach dieser Ausführung folgende Methodik: Gesamtalbumenbestimmung (s. Tabelle 1, S. 320).

Es wird zunächst 1 ccm Liquor mit 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt (Stammlösung); diese Stammlösung wird nun reihenmäßig mit physiologischer Kochsalzlösung laut Tabelle 1 verdünnt; nun wird in gleichen Teilen konzentrierte Salpetersäure mittels einer Pipette unterschichtet, wobei auf den Eiweißring zu achten ist, der an der Berührungsfläche Liquor-Salpetersäure auftritt. Die Ablesung erfolgt 3—5 Min. nachher gegen einen schwarzen Hintergrund am besten mit einer Lupe. Bei der Ablesung verwendet man jenes Röhrchen, welches eben noch einen minimen Eiweißring zeigt. In je stärkerer Verdünnung noch eine Ringbildung auftritt, um so höher ist die Konzentration im ursprünglichen Liquor. Der Nenner des Bruches, der diesen Verdünnungsgrad ausdrückt, gibt also einen Anhaltspunkt für den Gehalt des Eiweißes.

bzw. nur der betreffenden Eiweißfraktion, wie später noch besprochen wird. Auf der Tabelle 1 findet sich die Angabe in Promille neben den

Tabelle 1.

1 ccm Liquor auf 4 ccm physiolog. NaCl (Stammlösung)	Physiologische Kochsalzlösung	Verdünnungsgrad	Nach 3-5 Minuten ‰
0,5	—	1 : 5	0,166
0,45	0,09	1 : 6	0,200
0,4	0,2	1 : 7,5	0,250
0,3	0,3	1 : 10	0,333
0,25	0,35	1 : 12	0,400
0,2	0,4	1 : 15	0,500
0,2	0,6	1 : 20	0,666
0,2	0,7	1 : 22,5	0,750
0,1	0,4	1 : 25	0,833
0,1	0,5	1 : 30	1,000
0,1	0,6	1 : 35	1,166
0,1	0,7	1 : 40	1,333
0,1	0,8	1 : 45	1,500
0,1	0,9	1 : 50	1,666
0,1	1,1	1 : 60	2,000
0,1	1,3	1 : 70	2,333
0,1	1,4	1 : 75	2,500
0,1	1,5	1 : 80	2,666
0,1	1,7	1 : 90	3,000

Verdünnungsgraden. Aus der Promillezahl ergibt sich ohne Schwierigkeiten durch Umrechnung die Zahl in Milligramm-Prozent.

#### Bestimmung der Globuline.

Zu 1 ccm Liquor wird in ein Zentrifugenröhrenchen 1 ccm der konzentrierten, gesättigten Ammoniumsulfatlösung hinzugesetzt. Diese Lösung bleibt 4 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wird nun 30 Min. lang mit einer Zentrifuge, deren Tourenzahl in der Minute nicht unter 2000 liegt zentrifugiert und hierauf die überstehende Flüssigkeit sehr vorsichtig abgegossen. Der Niederschlag (Globulinmenge eines Kubikzentimeters Liquors) im Zentrifugenröhrenchen wird nun in Verdünnungen 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 in physiologischer Kochsalzlösung reihenmäßig aufgelöst. Zum Niederschlag gibt man zunächst 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung, pipettiert davon 0,1 ccm zur Darstellung des ersten Eiweißringes in ein bereitstehendes Röhrchen, gibt abermals 1 ccm physiologische Kochsalzlösung in das erste Glas und stellt hiermit die Verdünnung 1 : 2 auf. So fährt man fort bis zur Verdünnung 1 : 5. Von der Verdünnung 1 : 5 ab wird nach Tabelle 1 wiederum eine Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, mit konzentrierter Salpetersäure zu gleichen Teilen unterschichtet,

Tabelle 2. Typische unbehandelte Paralysen.

Fall-Nr.	Gesamt-Eiweiß (Konz. HNO <sub>3</sub> )	Globulin (Amm. Stoff.)	Gesamt-Albumin weniger Globulin	Eiweiß- Quotient E.Q.u.	Bemerkungen	
8	1 0/00	1:30	0,5 0/00	1:15	0,5 0/00	1:15
7	0,75 0/00	1:22,5	0,5 0/00	1:15	0,25 0/00	1:7,5
19	0,66 0/00	1:20	0,4 0/00	1:12	0,26 0/00	1:8
3	0,83 0/00	1:25	0,66 0/00	1:20	0,17 0/00	1:5
13	0,75 0/00	1:22,5	0,5 0/00	1:15	0,25 0/00	1:7,5
4	0,83 0/00	1:25	0,4 0/00	1:12	0,43 0/00	1:13
Mittel aus 6 Fällen	0,83 0/00		0,49 0/00		0,31 0/00	1,9

Tabelle 3. Behandelte Paralysen.

Fall-Nr.	Gesamt-Eiweiß (Konz. HNO <sub>3</sub> )	Globulin (Amm. Stoff.)	Gesamt-Albumin weniger Globulin	Eiweiß- Quotient E.Q.u.	Bemerkungen	
1	0,83 0/00	1:25	0,4 0/00	1:12	0,43 0/00	1:13
9	0,66 0/00	1:20	0,33 0/00	1:10	0,33 0/00	1:10
12	0,4 0/00	1:12	0,16 0/00	1:5	0,24 0/00	1:7
2	1 0/00	1:30	0,66 0/00	1:20	0,34 0/00	1:10
14	0,66 0/00	1:20	0,2 0/00	1:6	0,46 0/00	1:12
16	0,75 0/00	1:22,5	0,4 0/00	1:12	0,35 0/00	1:10,5
Mittel aus 6 Fällen	0,71 0/00		0,35 0/00		0,35 0/00	1,06

wobei abermals ein diesmal aber nur von den Globulinen herrührender Eiweißring an der Berührungsfläche auftritt. Die Ablesung und die Berechnung erfolgt analog der Methode der Gesamteiweißbestimmung. Es gehört zweifelsohne eine große Übung dazu, die letzten kleinen Eiweißringe richtig abzulesen und nicht zu übersehen. Es empfiehlt sich zur guten Sichtbarmachung der Eiweißgrenzringe und der Flüssigkeit sterile Glasröhren von kleinem Durchmesser zu nehmen (s. Abb. 1). Hat man nun die Globuline auf diese Weise gefunden, so subtrahiert man die Globulinzahl von der Gesamteiweißzahl und erhält so die Albuminzahl. Der Eiweißquotient ist dann Globulinzahl zur Albuminzahl. Die direkte Bestimmung aus der abgegossenen überstehenden Flüssigkeit des Zentri-

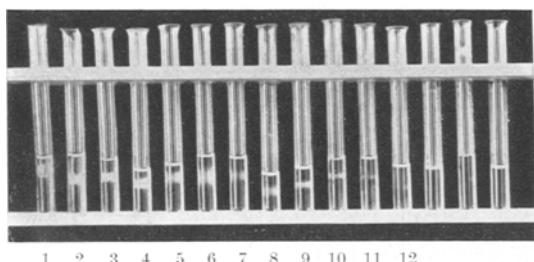


Abb. 1.

Abb. 1. Letzter eben noch sichtbarer Eiweißring bei Röhrchen Nr. 12 bei einer Verdünnung von 1 : 22,5, entspricht 0,75%<sub>00</sub>. Ungefärbte Eiweißringe.

Abb. 2. Bei Röhrchen Nr. 6 letzter Eiweißring, entspricht einer Verdünnung von 1 : 6 und einem Gehalt von 0,2%<sub>00</sub>. Ungefärbte Eiweißringe.

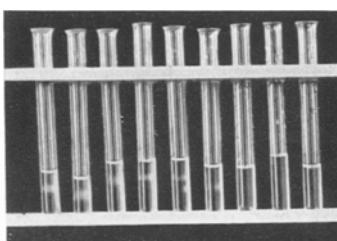


Abb. 2.

fugenröhrechens nach Ausfällung der Globuline an Hand einer analog angesetzten Verdünnungsreihe ergab unzuverlässige Befunde.

Zur besseren Veranschaulichung erkläre ich an Hand der Abb. 1 und 2 sowie der folgenden Berechnung ein Beispiel.

Gefunden wurde: Gesamteiweiß bei einer Verdünnung von 1 : 22,5 entspricht einem Gehalt von 0,75%<sub>00</sub>; letzter Ring im Röhrchen Nr. 12.

Globuline bei einer Verdünnung von 1 : 6 entspricht einem Gehalt von 0,2%<sub>00</sub>; letzter Ring im Röhrchen Nr. 6. Albumen = Gesamteiweiß — Globuline = 0,55%<sub>00</sub>, nach dem Verdünnungsgrad 1 : 17,5.

$$EQu = \frac{\text{Globuline}}{\text{Albumine}} = 0,36 = 0,34 \text{ nach dem Verdünnungsgrad.}$$

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, beginnt die Verdünnung bereits im Verhältnis 1 : 1. Ich möchte an dieser Stelle bemerken, daß man bei Liquoren mit positiven Globulinreaktionen wie Pandy und Nonne in der Mehrzahl der Fälle gleich mit der Verdünnungsreihe von 1 : 5 ab beginnen kann.

Über die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen, die sich vorwiegend über pathologisch veränderte Liquore erstrecken, geben die Tabellen 2, 3 und 4 Auskunft.

Tabelle 4. Schizophrenie.

Fall Nr.	Gesamt-Eiweiß (konz. HNO <sub>3</sub> )	Globulin (Amm. Sulf.)	Albumin Gesamt-Albumen weniger Globulin	Eiweiß- Quotient E Qu.	
7	0,5 %	1 : 15	1 : 3	1 : 12	0,25
6	0,33 %	1 : 10	1 : 2	1 : 8	0,25
10	0,66 %	1 : 20	1 : 5	1 : 15	0,33
20	0,5 %	1 : 15	1 : 4	1 : 11	0,36
5	0,33 %	1 : 10	1 : 2	1 : 8	0,25
11	0,33 %	1 : 10	1 : 3	1 : 7	0,43
15	0,4 %	1 : 12	1 : 2	1 : 10	0,2
18	0,5 %	1 : 15	1 : 2	1 : 13	0,15
Mittel aus 8 Fällen	0,44 %			0,27	

Es sei hervorgehoben, daß man mit all den Reihenverdünnungsmethoden, wie sie die eben beschriebene gleichfalls darstellt, niemals ganz exakte Werte bekommt, trotzdem besitzt diese Methode den Vorzug, daß sie ohne besondere Hilfsmittel in jedem kleinen Laboratorium ausgeführt werden kann, und daß sie, das muß für die Praxis betont werden, klinisch verwertbare Resultate gibt, wie dies aus den Vergleichswerten mit der *Kafkaschen* Methode ohne weiteres ersichtlich ist. Da die Anzahl der untersuchten Liquore eine noch nicht allzu große ist, unterlasse ich es, eine eingehende vergleichende Gegenüberstellung mit den Ergebnissen anderer Autoren durchzuführen und beschränke mich auf die Mittelwerte von *Kafka* und *Samson*. Die gleichsinnigen Mittelwerte nach *Kafka* und *Samson* werden in Klammern vergleichsweise hinzugesetzt.

Die Liquore unbehandelter Paralysen ergaben Mittelwerte des Gesamteiweißgehaltes von 83 mg-% (63,3 mg-%), des Globulingegehaltes von 49 mg-% (49,1 mg-%), des Albumingegehaltes von 31 mg-% (24,1 mg-%). Demnach findet man im Liquor unbehandelter Paralytiker eine mehr als dreifache Zunahme des Gesamteiweißes, einen nahezu normalen Albumingehalt und eine beträchtliche Globulinvermehrung. Die Liquor behandelte Paralytiker (Malaria) zeigen Mittelwerte des Gesamteiweißgehaltes von 71 mg-%, des Globulingegehaltes von 35 mg-%, des Albumingegehaltes von 35 mg-% und des Eiweißquotienten von 1,06 (0,93). Auffallend ist ein Absinken des Globulingegehaltes zugunsten des Albumingegehaltes, welche Verschiebung sich im Eiweißquotienten ausdrückt. Diesbezügliche Vergleichsmittelwerte nach *Kafka* liegen zur Zeit nicht vor. Ferner habe ich eine Anzahl von 8 Geisteskranken mit der Diagnose Schizophrenie untersucht und fand eine geringe Vermehrung des Gesamteiweißes auf

44 mg-% (48,2 mg-%) sowie eine allerdings nur geringe Erhöhung des Eiweißquotienten, dessen Mittelwert 0,27 (0,3) ist, wodurch die Befunde von *Kafka* bis zu einem gewissen Grade bestätigt wurden. Auch *Kafka* fand bei der Schizophrenie leicht erhöhten Gesamteiweißgehalt, der sich auf Globuline und Albumine gleichmäßig verteilt. Eine Erklärung für das Auftreten der nachweisbaren pathologischen Veränderungen im Liquor bei Schizophrenie ist bisher noch ausständig. Auf den Tabellen finden sich die detaillierten Werte übersichtlich angegeben.

Zusammenfassend glaube ich wohl sagen zu dürfen, daß diese Bestimmung der Eiweißrelation technisch einfach ist, klinisch verwertbare Ergebnisse gibt, und auch im kleinen Laboratorium ausführbar ist. Über die Färbung des Eiweißringes sowie über die folgenden Untersuchungsergebnisse werde ich später noch zu berichten haben.

---

### Literaturverzeichnis.

- Gärtner, B.:* Ein einfaches photometrisches Verfahren zur Bestimmung des Eiweißgehalts des Liquor cerebrospinalis. *Z. Neur.* **128**, H. 5/6, 641. — *Goria:* Note Psichiatr. **17**, 497—550 (1929). — *Halpern:* Über Stickstoff- und Eiweißverhältnisse im Liquor cerebrospinalis. *Z. Neur.* **121**, 283 (1929). — *Hewitt, L. F.:* Protein of the cerebrospinal fluid. *Brit. J. exper. Path.* **8**, Nr 1, 84—92 (1927). — *Jakobsthal u. Joel:* Liquoruntersuchungen. *Klin. Wschr.* **6**, Nr 40, 1896, 1899 (1927). — *Kafka, V.:* Der Eiweißquotient des Liquor cerebrospinalis. *Klin. Wschr.* **5**, Nr 44 (1926). — Die klinische Bedeutung des Eiweißquotienten des Liquor cerebrospinalis. Vortrag Wien 1927. *Verh. dtsch. Ges. Nervenheilk.* **1927**, 244. — *Kafka u. Samson:* Die Eiweißrelation des Liquor cerebrospinalis. II. Mitt.: Modifikation der Methode. Diskussion und Ergebnisse. *Z. Neur.* **115**, H. 1/2, 85 (1928). — *Kafka, Riebeling u. Samson:* Die Eiweißrelation im Liquor cerebrospinalis. VI. Mitt. *Z. Neur.* **131**, 610 (1931). — *Lange, C.:* Lumbalpunktion und Liquordiagnostik. Spezielle Pathologie und Therapie innerer Erkrankungen (*Kraus* und *Brugsch*), Bd. 2, 3. Teil. — *Matz, Novick:* Improved colorimetric procedures for the quantitative estimation of the proteins of the cerebrospinal fluid. *J. Labor. a. clin. Med.* **15**, 370 (1930). — *Wolffheim:* Liquordiagnostik mit dem Zeißschen Stufenphotometer. *Med. Klin.* **26**, 352 (1930). — *Zdenko Stary, Winternitz u. Kral:* *Z. Neur.* **132**, 193 u. 206.