

# Ueber die Anwendbarkeit des Magnesiumsulfates zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Serumalbumin und Globulinen.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 30. Mai 1884.)

In einem, im Jahre 1882 veröffentlichten Aufsätze: «Beiträge zur Chemie und Physiologie des Blutserums»<sup>1)</sup> hat Dr. A. E. Burckhardt einige Einwendungen gegen die Anwendung des Magnesiumsulfates zur Trennung des Serumglobulins von dem Serumalbumin erhoben, und in demselben Aufsätze theilt er auch ein Paar Versuche mit, durch welche er beweisen will, dass von dem genannten Salze mit dem Serumglobulin auch ein Theil des Serumalbumins ausgefällt werde. Es ist nun offenbar, dass, wenn diese Einwendungen begründet und die von Burckhardt mitgetheilten Versuche entscheidend wären, eine jetzt viel geübte Methode zur quantitativen Bestimmung des Serumalbumins und der Globuline — die Magnesiumsulfatmethode — als eine principiell unrichtige verworfen werden müsste, und aus diesem Grunde finde ich mich genöthigt, die von Burckhardt erhobenen, theoretischen und experimentellen Einwendungen durch einige neue Beobachtungen und Versuche ein wenig zu beleuchten. Einen weiteren Grund hierzu finde ich auch darin, dass die Einwürfe Burckhardt's direct gegen meine Versuche und die aus ihnen gezogenen Schlüsse gerichtet sind.

Von den in dem Folgenden mitzutheilenden Versuchen habe ich einige schon vor mehreren Jahren ausgeführt; die

<sup>1)</sup> Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 1882.

übrigen sind fast alle im Winter 1882—1883 ausgeführt worden. Durch Arbeiten anderer Art bin ich doch leider verhindert gewesen, die Resultate dieser meinen Untersuchungen der Oeffentlichkeit früher überzuliefern.

Die Anwendbarkeit der Magnesiumsulfatmethode setzt selbstverständlich Zweierlei voraus:

1. Das Magnesiumsulfat muss aus einer Flüssigkeit alles Globulin ausfällen, und
2. Es müssen nur Globuline, aber kein Serumalbumin durch dieses Salz ausgefällt werden.

Von diesen Voraussetzungen soll nach Burckhardt nur die erste von mir bewiesen worden sein, während die zweite durchaus nicht sicher gestellt sein soll. Dementsprechend spricht er auch die Meinung aus, dass es durchaus nicht bewiesen ist, «dass nicht ein Theil von demjenigen Eiweisskörper des Serums, den man bis auf Hammarsten Serumalbumin nannte, durch  $MgSO_4$  ausgefällt wird».

Um die Bedeutung dieses Ausspruches richtig beurtheilen zu können, dürfte es wohl nöthig sein, zuerst darüber, was man unter dem Namen Serumalbumin verstehen soll, einig zu werden.

Es dürfte wohl allgemein bekannt sein, dass man bis vor einigen Jahren als «Serumalbumin» alles Eiweiss bezeichnete, welches (abgesehen von den zweifelhaften Spuren von Peptonen) nach einem möglichst vollständigen Entfernen der Globuline mittelst Kohlensäure, Essigsäure oder Dialyse in dem Serum zurückgeblieben war; und es kann wohl also nicht der geringste Zweifel darüber bestehen, dass von diesem Serumalbumin (im älteren Sinne) auch ein Theil von dem Magnesiumsulfate ausgefällt wird. Dies ist wohl vielmehr eine festgestellte Thatsache, die sonst von Niemandem in Zweifel gezogen worden ist, und man kann also nach meiner Ansicht nur darüber streiten, ob dieser, erst durch Eintragen von  $MgSO_4$  fällbare Theil des «Serumalbumins» (im älteren Sinne) aus Globulinen oder aus einer Albuminsubstanz bestehe. Es führt uns dies also wieder zu der Frage, was

man unter dem Namen Serumalbumin oder Albuminsubstanzen verstehen soll, und ich muss noch einige Worte darüber sagen.

In meiner ersten Abhandlung über das Paraglobulin<sup>1)</sup> habe ich gezeigt, dass nach möglichst erschöpfender Fällung des Blutserums mit  $MgSO_4$  stets in bedeutender Menge ein coagulabler, in Wasser bei jeder Reaction löslicher Eiweissstoff in dem mit Salz gesättigten Filtrate in Lösung zurückbleibt. Diesen Stoff habe ich isolirt, ich habe Lösungen davon von wechselnder, bisweilen sehr grosser Concentration untersucht und dabei gefunden, dass dieser Stoff bei keiner Concentration von verdünnten Säuren oder Alkalien oder Neutralsalzen,  $NaCl$ , resp.  $MgSO_4$ , gefällt wird. Erinnerung man sich nun<sup>2)</sup>, dass die «Albumine» gerade durch Löslichkeit in Wasser, Nichtfällbarkeit für Kohlensäure, verdünnte Säuren, resp. Alkalien oder Neutralsalze — wie  $NaCl$  oder  $MgSO_4$  — charakterisirt sind, so findet man leicht, dass von sämmtlichen Eiweissstoffen des Blutserums nur dem eben genannten der Name Serumalbumin mit vollem Rechte zukommt. Aus diesem Grunde habe ich auch nur für den mit  $MgSO_4$  nicht fällbaren Theil der Eiweissstoffe des Blutserums den Namen Serumalbumin beibehalten, und hierin habe ich bei anderen Forschern im Allgemeinen Zustimmung gefunden. Wenn nun Burekhardt behauptet, dass das, aus einem durch Dialyse oder Kohlensäuredurchleitung erschöpfend gefällten Serum mit  $MgSO_4$  fällbare Eiweiss nicht aus Globulin besteht, so wird er gewiss auch gern zugeben, dass es ebenso wenig aus typischem Serumalbumin bestehen kann. Viel eher muss man wohl annehmen, dass in dem Blutserum neben den Globulinen und dem typischen Serumalbumin in reichlicher Menge noch ein 3ter, durch Dialyse oder Kohlensäuredurchleitung nicht, durch  $MgSO_4$  dagegen vollständig fällbarer Eiweissstoff sich vorfinde, der gewissermassen als eine Zwischenstufe zwischen dem Globulin und dem Serumalbumin anzusehen sei. Wenn

1) Pflüger's Archiv, Bd. 17.

2) Man vergleiche: Hoppe-Seyler, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 5. Aufl.

ich Burekhardt nicht missverstanden habe, will er auch nicht bestimmt den fraglichen Stoff als wahres Serumalbumin bezeichnen; er will vielmehr — wenn ich nicht irre — beweisen, dass dieser Stoff wegen seiner Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse eher zu den Albuminen als zu den Globulinen zu rechnen sei.

Ich bin nun in dieser Hinsicht bekanntlich von einer anderen Ansicht, in so ferne als ich auf Grund meiner älteren und besonders meiner fortgesetzten Untersuchungen denjenigen Theil der Serumeiweissstoffe, welcher bei gewöhnlicher Versuchsanordnung nicht durch Säurezusatz oder Dialyse, sondern erst durch Eintragen von  $MgSO_4$  gefällt wird, zu der Globulingruppe rechne. Ich spreche hier absichtlich von der «Globulingruppe», denn ich habe bekanntlich nie die Ansicht ausgesprochen, dass der durch Eintragen von  $MgSO_4$  erzeugte Niederschlag kein anderes Globulin als das Paraglobulin enthalten könne. Im Gegentheil sprach ich mich in meiner ersten Abhandlung über das Paraglobulin (Pflüger's Archiv, Bd. 17, S. 465) über diesen Gegenstand folgendermassen aus. «Ich will selbstverständlich nicht die Möglichkeit in Abrede stellen, dass neben dem Paraglobulin in dem mit  $MgSO_4$  erzeugten Niederschlage auch andere, noch nicht entdeckte Globuline oder albuminatähnliche Stoffe enthalten sein können.» Ich betrachte also, in Uebereinstimmung mit anderen Forschern, das  $MgSO_4$  als ein Fällungsmittel für Globuline im Allgemeinen, und ich will hier nur daran erinnern, dass die Anwesenheit von wenigstens einem anderen, dem Fibrinogen nahestehenden Globulin in dem, mit  $MgSO_4$  in dem Blutserum erzeugten Niederschlage vor ein Paar Jahren theils von Fredericq<sup>1)</sup> und theils von mir<sup>2)</sup> bewiesen worden ist. Dagegen habe ich stets behauptet, dass von dem  $MgSO_4$  kein Serumalbumin oder, allgemeiner gesagt, kein zu der AlbuminGruppe gehörender Eiweissstoff ausgefällt

1) Vergl. Jahresberichte über die Fortschritte der Thierchemie. Bd. 10, S. 170.

2) Vergl. Ebendaselbst. Bd. 12, S. 11.

wird — eine Ansicht, die ich aus später anzuführenden Gründen auch fortwährend aufrecht erhalten muss.

Der Umstand, dass von demjenigen Eiweiss, welches aus dem Blutserum durch  $MgSO_4$  gefällt wird, unter gewöhnlichen Verhältnissen durch Säurezusatz oder Dialyse nur ein Theil gefällt werden kann, ein anderer Theil dagegen nicht, könnte auf zweierlei Weise erklärt werden. Man könnte einerseits annehmen, dass dieser, nur durch  $MgSO_4$  fällbare Theil aus einem besonderen oder jedenfalls nicht zu der Globulingruppe gehörenden Eiweissstoffe bestehe, und man könnte andererseits auch die Annahme machen, dass er nur ein Rest des Globulins sei, dessen Ausfällung mittels Dialyse oder Säurezusatz durch besondere, in dem Serum obwaltende Verhältnisse oder darin sich vorfindende globulinlösende Stoffe verhindert worden sei. Die erste Möglichkeit entspricht der Burckhardt'schen Ansicht, die zweite der meinigen.

Die Ansicht von Burckhardt basirt sich auf ein Paar Versuche, an die ich hier ganz kurz erinnern will. Burckhardt entfernte erst, so weit wie thunlich, durch Dialyse das Paraglobulin aus dem Serum, trug dann in das Filtrat  $MgSO_4$  bis zur Sättigung ein, filtrirte den Niederschlag ab und brachte ihn auf einen Dialysator. Er beobachtete nun, dass der Niederschlag nach einiger Zeit sich wieder auflöste; wenn aber durch die Diffusion auch alles Magnesiumsulfat entfernt worden war, so schied sich doch kein neuer Niederschlag aus, selbst dann nicht, wenn er Kohlensäure oder Essigsäure zu Hülfe nahm. Wenn er dagegen das typische, durch Dialyse aus dem Serum dargestellte Paraglobulin in ganz wenig  $NaCl$ -Lösung gelöst und mit  $MgSO_4$ -Krystallen angerührt auf einen Dialysator brachte, so löste es sich zwar anfangs, fiel aber nach einiger Zeit selbst ohne Kohlensäure oder Essigsäure in gänzer Grösse wieder aus. (Für die vollständige Wiederausfällung dieses Paraglobulins durch Dialyse hat der Verfasser doch in den veröffentlichten Versuchsprotokollen keine Beweise mitgetheilt.)

Aus diesen Versuchen zieht nun Burckhardt den Schluss, dass es ein mit  $MgSO_4$  fällbares Serumalbumin gebe, oder wenigstens, dass der erst durch Eintragen von  $MgSO_4$  fällbare Theil der Serumeiweissstoffe eher zu den Albuminen als zu den Globulinen zu rechnen sei. Dass eine solche Ansicht mit den nun referirten Versuchen sich vereinbaren lässt, will ich gar nicht läugnen; aber dagegen kann ich gar nicht finden, dass diese Versuche einen wirklichen Beweis, sei es für die Burckhardt'sche Ansicht oder gegen die meinige enthalten.

Es dürfte wohl allgemein bekannt sein, dass — wie dies zuerst von Alex. Schmidt gezeigt worden ist — die Lösung des Paraglobulins in dem Serum theils durch die Gegenwart von Alkalien und Salzen und theils durch die Anwesenheit von anderen, nicht näher bekannten Stoffen vermittelt wird. Von diesen Lösungsmitteln werden die Alkalien und Salze durch Kohlensäuredurchleitung (resp. Essigsäurezusatz) oder Dialyse unwirksam gemacht; wie aber die anderen Stoffe, welche die Löslichkeit des Paraglobulins in Wasser bei Abwesenheit von Alkalien, (resp. Salzen) vermitteln, gegenüber der Dialyse oder dem Zusatze von Säuren sich verhalten, ob sie dadurch theilweise zerstört oder unwirksam gemacht werden, ob sie dabei gar nicht verändert und bei Zusatz von  $MgSO_4$  mit ausgefällt werden etc., darüber wissen wir eigentlich nichts. Ebenso wenig kann man die Möglichkeit in Abrede stellen, dass ein Theil der Globuline in dem Serum in einer solchen Verbindung enthalten oder derart von anderen Stoffen verunreinigt sei, dass er nicht einfach durch Dialyse oder Kohlensäuredurchleitung ausgefällt wird; und wenn diese Vermuthung richtig wäre (was — wie wir später sehen werden — in der That der Fall zu sein scheint), könnte man ja im Voraus fast erwarten, dass dieser Theil der Globuline bei der von Burckhardt befolgten Versuchsanordnung bei erneuerter Dialyse sich nicht wieder ausscheiden würde.

Ich kann also in den von Burckhardt mitgetheilten Versuchen keine Beweise sehen und ich glaube vielmehr,

dass die Hauptfrage von ihnen nicht wesentlich berührt wird. Es handelt sich doch nämlich vor Allem darum zu entscheiden, ob der gewöhnlichenfalls nur durch  $MgSO_4$  fällbare Theil der Serumeiweissstoffe aus einem Globulin von veränderter Löslichkeit, resp. Fällbarkeit, oder aus einem Eiweissstoffe besonderer Art besteht, und diese Frage kann, wie ich glaube, erst durch ein mehr eingehendes Studium des fraglichen Eiweisses ihre Erledigung finden.

Nachdem ich nun die von Burckhardt ausgeführten Versuche besprochen habe, gehe ich zu denjenigen meiner eigenen Beobachtungen über, auf Grund derer ich zu der Ansicht geführt wurde, dass der aus einem mittelst Dialyse oder Säurezusatz erschöpfend gefällten Serum mit  $MgSO_4$  fällbare Stoff wirklich aus Globulin besteht. Es haben mich nun zwar mehrere Beobachtungen zu dieser Ansicht geführt; aber unter diesen sind doch die zwei folgenden die wichtigsten.

Ich habe

1. Mehrmals beobachtet, dass Lösungen von gereinigtem Paraglobulin nicht durch Säurezusatz (resp. Kohlen-säuredurchleitung) oder Dialyse, sondern erst von  $MgSO_4$  vollständig gefällt werden, und schon aus diesem Grunde konnte ich fast mit Bestimmtheit sagen, dass eine vollständige Ausfällung des Globulins aus dem Serum nach den älteren Methoden noch weniger möglich sein würde und dass in Folge dessen auch ein Rest von nicht gefälltem Paraglobulin in dem Serum mit  $MgSO_4$  nachgewiesen werden können müsste. Ich habe
2. Beobachtet, dass die Globulinnatur desjenigen Niederschlages, der in einem durch Dialyse oder Säurezusatz möglichst erschöpfend gefällten Serum mit  $MgSO_4$  erzeugt wird, durch ein etwas modificirtes Verfahren leicht und sicher bewiesen werden kann; und gerade diese zweite Beobachtung musste selbstverständlich für mich entscheidend sein.

In diesem Aufsätze werde ich deshalb auch hauptsächlich diese zwei Beobachtungen zum Gegenstand einer eingehenderen Besprechung machen.

Ich habe, wie oben gesagt, wiederholt die Beobachtung gemacht, dass sorgfältig gereinigtes Paraglobulin, welches durch mehrtägige Dialyse von den Salzen möglichst befreit worden war, weder durch fortgesetzte Dialyse noch durch darauffolgenden Zusatz von Essigsäure oder Kohlensäuredurchleitung vollständig gefällt werden konnte. Die Flüssigkeit gerann zwar — wegen ihrer Armuth an Salzen — beim Sieden nicht, aber bei sehr vorsichtigem Essigsäurezusatz zu der siedenden Flüssigkeit, wie auch durch Sättigung mit  $MgSO_4$  konnte die Gegenwart von in der Lösung zurückgebliebenem Paraglobulin leicht demonstriert werden.

Ich suchte diese Beobachtung durch die Annahme zu erklären, dass das Paraglobulin (da es nach der gewöhnlichen Annahme in Wasser nicht löslich sein soll) von irgend einem Stoffe verunreinigt gewesen sei, der seine Löslichkeit in Wasser bei Abwesenheit von Alkalien oder Salzen vermittelte. Dieser Erklärung trat dann Burckhardt in seinem Aufsätze entgegen, und er machte auf Grund seiner oben referirten Versuche die Annahme, dass der nur durch  $MgSO_4$  fällbare Eiweissstoff meiner Paraglobulinlösungen aus einem dem Serumalbumin verwandten Stoffe bestanden habe. Eine solche Annahme könnte natürlich nur in dem Falle berechtigt sein, dass ich mein Paraglobulin aus dem Serum mit Hülfe von  $MgSO_4$  dargestellt hatte. Dies ist indessen gar nicht der Fall. Meine Angaben beziehen sich nur auf das, wie gewöhnlich durch Dialyse oder Säurezusatz zu dem verdünnten Serum dargestellte, durch abwechselndes Ausfällen und Wiederauflösen gereinigte Paraglobulin, welches von allen Forschern und auch von Burckhardt als typisches Paraglobulin bezeichnet wird. Die Annahme von Burckhardt ist also eine irrige; damit aber der Leser selbst im Stande gesetzt werde, den Werth meiner Angaben zu beurtheilen, will ich hier einige Versuche mittheilen:

Versuch 1. Es wurden 100 ccm. Pferdeblutserum mit Chlorwasserstoffsäure genau neutralisirt und dann der Dialyse unterworfen. Nach 24 Stunden wurde das ausgeschiedene Paraglobulin abfiltrirt, mit Wasser auf dem Filter gewaschen und in  $NaCl$ -Lösung von 5% auf-

gelöst. Bei erneuerter Dialyse schied sich binnen einer Stunde ein Niederschlag aus, der innerhalb drei Stunden noch reichlich vermehrt wurde. Nach Verlauf von 24 Stunden, während welcher das Wasser fleissig gewechselt worden war, wurde der Niederschlag abfiltrirt und das Filtrat in einen neuen, offenen Dialysator gebracht. Im Laufe der nächsten 24 Stunden schied sich, trotz mehrmaligem Wechseln des Wassers gar kein neuer Niederschlag aus; aber trotzdem wurde die Dialyse noch 24 Stunden fortgesetzt. Die so erhaltene, dialysirte Lösung konnte durch Zusatz von Essigsäure, selbst bei der allergrössten Vorsicht, nicht gefällt werden. Bei anhaltendem Durchleiten von Kohlensäure wurde die Lösung erst nach längerer Zeit opalisirend, ohne eine deutlich sichtbare Fällung zu geben. Erst nach 48 Stunden (während welcher die Flüssigkeit auf einem kühlen Orte aufbewahrt worden war) war eine ganz unbedeutende, sehr feine Fällung sichtbar, von der die Flüssigkeit ganz klar abfiltrirt werden konnte. Das zuletzt erhaltene Filtrat konnte nun in keiner Weise, weder bei Durchleitung von Luft, noch von mehr  $\text{CO}_2$ , noch durch Essigsäurezusatz oder Dialyse, gefällt werden. Beim Eintragen von  $\text{MgSO}_4$  bis zur Sättigung wurde es dagegen feinflockig gefällt. Beim Erhitzen zum Sieden gerann dieses Filtrat erst nachdem eine Spur von Essigsäure und ein wenig Natriumacetat oder Chlornatrium zugesetzt worden war. Während dieses Versuches, der im November 1882 ausgeführt wurde, variierte die Lufttemperatur zwischen  $-4$  und  $-22^{\circ}\text{C}$ . Die Temperatur des Versuchszimmers war  $+1^{\circ}$  à  $-2^{\circ}\text{C}$ .

Trotzdem, dass ich in diesem Falle das Paraglobulin aus dem Serum durch Dialyse ausgefällt hatte, konnte es, nachdem es in Kochsalzlösung aufgelöst worden war, weder durch neue Dialyse noch durch Kohlensäuredurchleitung oder Essigsäurezusatz vollständig wieder ausgefällt werden. Es blieb ein, wenn auch sehr kleiner Theil des Globulins in dem Wasser zurück und dieser Theil konnte erst durch  $\text{MgSO}_4$  ausgefällt werden.

Der in Lösung zurückbleibende Theil des Globulins ist zwar im Allgemeinen nur klein; aber er kann, wie es scheint, nicht unbedeutend wechseln. Unter Umständen ist er sogar ziemlich gross, und da es von Interesse ist zu sehen, wie gross dieser Theil sein kann, habe ich auch einige quantitative Bestimmungen ausgeführt, die ich hier mittheilen will.

Versuch 2. Serumglobulin, aus neutralisirtem Pferdeblutserum durch Dialyse gefällt, wurde durch zweimalige Auflösung in verdünnter Kochsalzlösung und Ausfällung mit Wasser gereinigt, zuletzt in verdünnter Kochsalzlösung aufgelöst und dialysirt. Nach 24 Stunden wurde filtrirt und das Filtrat neue 48 Stunden dialysirt. Es schied sich während dieser Zeit keine Spur von Paraglobulin aus; bei Kohlensäuredurchleitung trat aber ein Niederschlag, der abfiltrirt wurde, auf. Danach konnte die Flüssigkeit weder durch Dialyse noch durch Essigsäure oder Kohlensäure gefällt werden. Sie enthielt  $0.032\%$  Globulin, welches mit  $\text{MgSO}_4$  ausgefällt werden konnte.

**Versuch 3.** Das Paraglobulin war aus dem mit 10 Volum Wasser verdünnten Serum durch Zusatz von Essigsäure ausgefällt worden. Im Uebrigen wurde es wie in dem vorigen Versuche behandelt. Die Menge des in Lösung zurückgebliebenen, weder durch Dialyse noch durch Essigsäurezusatz oder Kohlendurechleitung fällbaren Globulins war 0,164%.

**Versuch 4.** Das Paraglobulin wurde wie in dem vorigen Versuche aus dem verdünnten Serum mit Essigsäure gefällt und durch wiederholtes Auflösen in Kochsalzlösung und Ausfällen mit Wasser gereinigt. Zuletzt wurde es in verdünnter Kochsalzlösung aufgelöst und die Lösung dialysirt. Nach möglichst erschöpfender Dialyse enthielt die Flüssigkeit 0,136% Globulin. Beim Durchleiten von Kohlendurech trat doch eine recht bedeutende Fällung auf, und das neue Filtrat, welches nunmehr weder durch Dialyse noch durch Essigsäurezusatz oder Kohlendurechleitung gefällt werden konnte, enthielt nur 0,040% Globulin.

**Versuch 5.** Das Globulin war aus neutralisirtem Rindserum durch Dialyse ausgefällt worden. Behufs der weiteren Reinigung wurde es wie gewöhnlich in verdünnter Kochsalzlösung aufgelöst und mit Wasser wieder gefällt. Zuletzt wurde es in Wasser mit Hilfe von ein wenig NaCl gelöst und diese Lösung dialysirt. Nach 2-tägiger Dialyse wurde der Globulinniederschlag abfiltrirt und das Filtrat in einen neuen Dialysator gebracht. In den nächsten 24 Stunden schied sich wieder ein sehr spärlicher Niederschlag aus, der abfiltrirt wurde. Das Filtrat wurde in einen neuen Dialysator gebracht und wieder 48 Stunden dialysirt. Es trat während dieser Zeit keine Spur einer Fällung auf, und das erschöpfend dialysirte Filtrat enthielt trotzdem noch 0,262% Globulin. Von Essigsäure wurde dieses Filtrat nur bei sehr vorsichtigem Zusatz von einer höchst verdünnten Säure gefällt; beim Durchleiten von Kohlendurech trat dagegen eine reichliche Fällung auf. Die mit Kohlendurech gefällte, filtrirte, durch Stehen in der Luft von überschüssiger Kohlendurech befreite und wieder filtrirte Flüssigkeit konnte nunmehr in keiner anderen Weise als durch Eintragen von  $MgSO_4$  gefällt werden. Die Menge des in Lösung zurückgebliebenen Paraglobalins war 0,080%.

**Versuch 6.** Globulin aus einer Pleuraflüssigkeit durch Dialyse nach vorheriger Neutralisation ausgefällt und durch Auflösen in Kochsalzlösung und Fällung mit Wasser gereinigt. Die Lösung dieses Globulins in Wasser und ein wenig NaCl wurde erst 48 Stunden dialysirt, dann vom Niederschlage abfiltrirt und von Neuem 24 Stunden gegen Wasser dialysirt. Es schied sich dabei gar kein Globulin mehr aus, und die erschöpfend dialysirte Flüssigkeit enthielt 0,144% Globulin. Durch Zusatz von Essigsäure konnte diese Lösung nicht gefällt werden und beim Durchleiten von einem Kohlendurechstrom während einer Stunde

mit erst sehr langsam eine Trübung auf. Erst 24 Stunden später enthielt die Flüssigkeit eine wirkliche Fällung, die abfiltrirt werden konnte, und das neue Filtrat, welches weder durch Dialyse noch durch Luft- oder Kohlensäuredurchleitung, wohl aber durch Sättigung mit  $MgSO_4$  gefällt werden konnte, enthielt noch  $0,124^0$  Paraglobulin.

Sämmtliche nun mitgetheilten Versuche sind im Winter ausgeführt worden, und es war also leicht jede Zersetzung durch beginnende Fäulniss zu verhindern.

Wie wir aus dem nun Mitgetheilten ersehen, konnte also in keinem der mitgetheilten Versuche das gereinigte Paraglobulin durch Dialyse vollständig ausgefällt werden; und ich kann zufügen, dass eine ganz vollständige Ausfällung des gereinigten Paraglobulins (aus Pferdeblutserum dargestellt) mittels Dialyse bisher in keinem Falle mir gelungen ist. Dass es hierbei um wahres Paraglobulin sich gehandelt habe, dürfte wohl aus den oben mitgetheilten Versuchen klar sein; und die Unrichtigkeit der von Burckhardt versuchten Erklärung meiner Beobachtungen liegt also auf der Hand. Ich habe übrigens den durch Dialyse, Säurezusatz, oder Kohlensäuredurchleitung nicht fällbaren Rest des Globulins mit  $MgSO_4$  gefällt, in Wasser mit Hülfe von dem verunreinigenden Salze gelöst und auf die Gerinnungstemperatur geprüft. Die Gerinnung erfolgte, wie für das gewöhnliche Paraglobulin, bei  $+ 75^{\circ} C$ .

Bei Beurtheilung von diesen Versuchen muss man folgendes sich erinnern. Das Serum wurde stets vor der Dialyse mit Chlorwasserstoffsäure bis zu neutraler — oder richtiger amphoterer — Reaction versetzt oder auch nach Verdünnung mit Wasser mit Essigsäure gefällt. Das ausgefällte Globulin wurde weiter nie mit Hülfe von etwas Alkali, sondern stets durch Zusatz von ein wenig  $NaCl$  in Wasser gelöst, und es handelte sich in diesem Falle also nicht um eine Alkaliverbindung des Globulins, in welchem Falle die unvollständige Fällbarkeit durch Dialyse leicht verständlich gewesen wäre. Die Menge des in Lösung gebliebenen Paraglobulins war zwar in den meisten Versuchen nur eine sehr kleine, in zwei war sie aber  $0,124$ , resp.  $0,164^0$ , was wohl

keine zu vernachlässigende Menge ist; und wenn solche Mengen bei der Dialyse von Lösungen des möglichst sorgfältig gereinigten Paraglobulins unausgefällt bleiben können, wie ist es denn zu bezweifeln, dass bei der Dialyse des Blutserums selbst noch grössere Mengen von Globulin in Lösung bleiben werden.

Nun habe ich bekanntlich in einem früheren Aufsätze mehrere Beweise für die Ansicht geliefert, dass durch Dialyse oder Essigsäurezusatz, resp. Kohlensäuredurchleitung nur eine sehr unvollständige Ausfällung des Globulins aus dem Serum zu erzielen ist, und dass dementsprechend eine reichliche Menge von nur durch  $MgSO_4$  fällbarem Globulin bei dem alten Verfahren in dem Serum zurückbleibt. Burekhardt findet nun diese Beweise unzureichend und er behauptet im Gegensatz zu meiner Ansicht, dass sämtliches Globulin durch Dialyse, resp. Säurezusatz direkt aus dem Serum gefällt werden kann. In Uebereinstimmung hiermit betrachtet er auch das bei diesem Verfahren in dem Serum zurückbleibende, nur durch  $MgSO_4$  fällbare Eiweiss nicht als Globulin sondern, wie oben gesagt, nur als einen albuminähnlichen Stoff. Aus diesem Grunde muss ich also zu meinen früheren Beweisen noch einen neuen fügen, und ich gehe damit zu dem zweiten Theile meiner Untersuchung über. Dieser zweite Theil betrifft also die Natur des bei der älteren, auch von Burekhardt befolgten Versuchsanordnung aus dem Serum nicht einfach durch Dialyse oder Säurezusatz, sondern erst durch Zusatz von  $MgSO_4$  fällbaren Eiweisses.

Meine Aufgabe musste bei dieser Untersuchung die folgende sein. Erstens musste ich das Globulin durch Dialyse und Säurezusatz, resp. Kohlensäuredurchleitung möglichst vollständig entfernen, und dann musste ich das aus dem so behandelten Serum mit  $MgSO_4$  gefällte Eiweiss einer eingehenderen Prüfung unterwerfen.

Behufs einer, so weit wie möglich, vollständigen Ausfällung des Globulins aus dem Serum mittels Dialyse verfuhr Burekhardt in der Weise, dass er das vorher nicht neutralisirte, mit 3—4 Volum Wasser verdünnte Serum auf einen

Dialysator brachte und einer etwa 48stündigen Dialyse unter mehrmaligem (2-8 mal in 24 Stunden) Wechseln des Aussenwassers unterwarf. Der Controle halber wurde das Serum noch einige Zeit dialysirt und dann durch Essigsäurezusatz auf einen Gehalt von nicht ausgefälltem Paraglobulin geprüft.

Nach meiner Erfahrung führt nun ein solches Verfahren nicht ganz sicher zum Ziele, denn es ist etwas gar nicht ungewöhnliches, dass ein Serum, welches durch fortgesetzte Dialyse nicht im Geringsten getrübt und durch Essigsäurezusatz nicht gefällt wird, nach weiterer Verdünnung mit Wasser und Kohlensäuredurchleitung einen neuen, wenn auch nur spärlichen Niederschlag giebt. Vor Allem kann man leicht grobe Fehler begehen, wenn man das Serum nicht vor der Dialyse genau neutralisirt und bei der Prüfung mit Essigsäure nicht eine höchst verdünnte Säure mit der allergrössten Vorsicht zusetzt.

Aus diesen Gründen änderte ich das Verfahren ein wenig ab, insofern als ich das Serum vor der Dialyse stets neutralisirte und auch mit grösseren Mengen Wasser verdünnte. Uebrigens hatte ich wiederholt gesehen, dass die Dialyse weit energischer in den von Kühne eingeführten künstlichen Wursthülsen als in den gewöhnlichen offenen Dialysatoren von Statten geht, und darum habe ich auch die meisten Versuche auf jene Weise ausgeführt.

In einigen der ersten Versuche wurde das neutralisirte Serum vor der Dialyse mit neun Volum Wasser verdünnt; da aber ein solches Verfahren die Unannehmlichkeit mit sich führte, dass ich (da ja mindestens 100—200 ccm. Serum in Arbeit genommen werden mussten) mit einer ungeheuren Anzahl von Schläuchen zu arbeiten genöthigt wurde, und da übrigens aus einem derart verdünnten Serum die Salze nur äusserst langsam durch Dialyse entfernt werden können, zog ich es im Allgemeinen vor, das neutralisirte Serum vor der Dialyse gar nicht oder nur mit 3—4 Volumen Wasser zu verdünnen und erst nach beendeter Dialyse die übrige Menge Wasser zuzusetzen.

Durch die Untersuchungen von Alex. Schmidt<sup>1)</sup> wissen wir, dass das frisch gefällte, auf dem Filtrum gesammelte Paraglobulin unter dem Einflusse der Luft in eine durchscheinende, syrupöse Masse sich verwandeln kann, welche in destillirtem Wasser löslich ist. Wenn also das ausgefällte Paraglobulin in reinem Wasser löslich werden kann, so ist es ja gar nicht unmöglich, dass bei anhaltender Dialyse ein Theil des ausgeschiedenen Paraglobulins, welches in dünner Schicht ausgebreitet ist, sich wieder auflösen könnte. Aus diesem Grunde habe ich, der Vorsicht halber, in sämmtlichen oben mitgetheilten Versuchen mit Lösungen von gereinigtem Paraglobulin den durch Dialyse erzeugten Paraglobulinniederschlag stets nach 24 oder höchstens 48 Stunden durch Filtration von der Flüssigkeit getrennt und diese einer erneuerten Dialyse unterworfen. Bei Dialyseversuchen mit künstlichen Wursthülsen könnte vielleicht ein ähnliches Verfahren ganz überflüssig erscheinen; da man aber bei Versuchen dieser Art wohl nie zu viel Vorsicht verwenden kann, habe ich mir es immer zur Regel gemacht, den Niederschlag nach 24 Stunden abzufiltriren und das Filtrat in andere Dialysatorschläuche überzuführen.

In diesen Versuchen, wo das Serum in Schläuchen aus Pergamentpapier dialysirt wurde, war die Dialyse regelmässig innerhalb 24 Stunden ganz beendet, und nur selten gab das Filtrat bei fortgesetzter Dialyse einen neuen Niederschlag. Nach beendeter Dialyse wurde das Filtrat mit so viel Wasser verdünnt, dass sein Volumen mindestens das Zehnfache des ursprünglich in Arbeit genommenen Serums betrug. Bei dieser Verdünnung trat sehr oft ohne Weiteres eine sichtbare Trübung auf, und bei anhaltender Kohlendurchleitung durch das so verdünnte Serum trat regelmässig eine stärkere Trübung auf, welche allmählich in eine feine, nur langsam zum Boden sinkende Fällung überging.

Bei dieser Gelegenheit will ich auch einer Eigenthümlichkeit der Globulinniederschläge Erwähnung thun, die wahrscheinlich auch von Anderen, welche mit den Eiweissstoffen

1) Pflüger's Archiv, Bd. 8, S. 432.

des Serums viel gearbeitet haben, wiederholt beobachtet worden ist. Ich meine die ungleiche physikalische Beschaffenheit der Globulinniederschläge bei verschiedenen Gelegenheiten.

Derjenige Globulinniederschlag, welcher in dem neutralisirten Serum durch Dialyse oder in dem mit Wasser verdünnten Serum durch einen Kohlensäurestrom erzeugt wird, hat bekanntlich regelmässig eine lockere, feinflockige Beschaffenheit. Entfernt man aber aus dem Serum das Paraglobulin erst möglichst vollständig durch Dialyse, und leitet man dann durch dieses Serum nach der Verdünnung mit Wasser einen Kohlensäurestrom, so scheidet sich, wie oben gesagt, noch eine merkliche Menge von Globulin aus; aber dieses Globulin hat nicht immer das gewöhnliche Aussehen, sondern es bildet bisweilen am Boden des Gefässes eine zähe, kleberige Schicht. Versucht man es, diesen Niederschlag mit einem Glasstabe oder einem Platinspatel von dem Boden des Gefässes zu entfernen, so ballt er sich zu einer zähen, mehr oder weniger durchsichtigen Masse zusammen, welche ein ganz anderes Aussehen als das gewöhnliche Paraglobulin hat.

Arbeitet man mit einem Transsudate vom Menschen, so erhält man bisweilen direkt bei der Fällung des mit Wasser verdünnten Transsudates mit Kohlensäure einen Globulinniederschlag von der oben genannten, kleberigen Beschaffenheit. Ebenso ereignet es sich bisweilen bei der Dialyse von einem Transsudate in offenen Dialysatoren, dass der Globulinniederschlag auf dem Pergamentpapier als eine zähe, dünne, durchsichtige Schicht liegt, während die Flüssigkeit selbst klar bleibt. Dieser Niederschlag haftet regelmässig sehr fest an dem Papiere, und wenn man ihn davon zu entfernen versucht, ballt er sich zu einer zähen Masse zusammen. Uebrigens bemerkt man in einigen Transsudaten Uebergangsformen zwischen diesem, eminent zähen, klebrigen und dem gewöhnlichen, feinflockigen Globulinniederschlage.

Dass der nun beschriebene, in dem Serum oder den Transsudaten bisweilen auftretende, zähe Niederschlag wirklich aus Paraglobulin besteht, lässt sich leicht zeigen. Löst

man ihn in verdünnter Kochsalzlösung, so zeigt nämlich diese Lösung alle Eigenschaften einer Paraglobulinlösung. Andererseits gelingt es auch leicht, aus dem zähen, kleberigen Niederschlage durch wiederholtes abwechselndes Auflösen und Ausfällen einen ganz typischen Paraglobulinniederschlag darzustellen.

Dass es in diesen Fällen um ein mehr als gewöhnlich unreines Paraglobulin sich handelte, kann wohl kaum bezweifelt werden, da es ja möglich war, aus ihm durch Reinigung ein typisches Paraglobulin zu gewinnen. Welcher Art diese, das Paraglobulin verunreinigenden Stoffe sein mögen, kenne ich nicht, und ebensowenig lässt es sich jetzt sagen, ob sie irgend welche Bedeutung für die Löslichkeit des Paraglobulins in dem Serum haben können. Uebrigens bemerke ich noch ein Mal, dass eine derartige, kleberige Beschaffenheit des Paraglobulinniederschlages nur bisweilen und verhältnissmässig selten zu beobachten ist. Vor Allem gilt die von dem mit Dialyse oder Kohlensäure (und Verdünnung mit Wasser) in dem Serum oder einem Transsudate direkt erzeugten Niederschlage, während das aus einem erst dialysirten und dann mit Wasser verdünnten Serum mit Kohlensäure ausgefällte Globulin etwas öfter eine kleberige Beschaffenheit hat.

Ich kehre jetzt zu den Versuchen wieder zurück. Wenn ich das neutralisirte und dialysirte Serum mit Wasser verdünnte und darauf Kohlensäure durchleitete, trat, wie oben gesagt, regelmässig ein neuer Globulinniederschlag auf. Dieser Niederschlag setzte sich regelmässig sehr langsam zu Boden: oft dauerte es mehrere Tage, bevor er sich vollständig abgesetzt hatte, und darum wartete ich gewöhnlich das vollständige Absetzen nicht ab, sondern filtrirte die Flüssigkeit nach etwa 12 Stunden wiederholt durch mehrfache Filtern aus dickem Papiere, bis ein ganz klares, in der Luft nicht weiter sich trübendes Filtrat erhalten wurde. Von diesem Filtrate nahm ich dann mehrere kleine Proben, welche theils mit Essigsäure, resp. Kohlensäure und theils mit fortgesetzter Dialyse geprüft wurden. Bei dieser Prüfung wurde das Filtrat

regelmässig nicht im Geringsten getrübt, und dementsprechend könnte man glauben, dass sämtliches fällbare Globulin ausgefällt worden wäre. Dem war aber nicht immer so. Wenn ich nämlich das Filtrat mit mehr Wasser verdünnte und von Neuem mit einem Kohlensäureströme behandelte, trat bisweilen nach einiger Zeit eine Trübung auf, und nach längerer Zeit war eine feine, äusserst langsam untersinkende Fällung sichtbar. Selbst durch Verdünnung mit Wasser allein ohne Kohlendurchleitung trübte sich das Filtrat bisweilen; und wenn die feine Fällung durch wiederholtes Filtriren durch mehrfache Filtern entfernt worden war, trübte sich dieses neue Filtrat bisweilen bei noch stärkerer Verdünnung mit Wasser. Auf diese Weise wurde das Filtrat zuletzt so stark mit Wasser verdünnt, dass es zu weiterer Untersuchung nicht verwendet werden konnte.

Wegen dieses Verhaltens, welches vor Allem bei Versuchen mit Pferdeblutserum zu beobachten ist, und welches übrigens schon von Eichwald<sup>1)</sup> eingehender studirt worden ist, habe ich viele Versuche mit Pferdeblutserum unterbrechen müssen. Bei Versuchen mit Rindsblutserum, wie auch mit Transsudaten vom Menschen gelang mir die Ausfällung des Globulins mit Dialyse, Verdünnung mit Wasser und Kohlendurchleitung dagegen verhältnissmässig leicht; aber ich habe auch mehrere Versuche mit Pferdeblutserum ausgeführt, in welchen die Ausfällung der Globuline auf die obengenannte Weise gut gelang.

Wenn ich nach beendeter Dialyse des vorher neutralisirten Serums, Verdünnung mit Wasser auf das Zehnfache, Durchleiten von Kohlensäure und Filtration von dem entstandenen Niederschlage ein klares Filtrat erhalten hatte, welches weder durch Dialyse noch durch Zusatz von Essigsäure oder Durchleitung von Kohlensäure, resp. einem Luftströme getrübt wurde, und wenn dieses Filtrat bei Zusatz von dem gleichen Volumen Wasser innerhalb 12 Stunden

<sup>1)</sup> E. Eichwald jun.: Beiträge zur Chemie der gewebbildenden Substanzen etc. H. 1. Berlin 1873.

nicht merkbar sich trübte, betrachtete ich die Ausfällung des Globulins als eine möglichst gelungene.

Aus dem so vorbereiteten Serum sollte nun der nur mit  $MgSO_4$  fällbare Eiweissstoff durch Sättigung mit  $MgSO_4$  ausgefällt werden. Da das Serum in Folge der vorausgegangenen Prozeduren so stark mit Wasser verdünnt worden war, dass sein Volumen oft mehrere Liter betrug, konnte selbstverständlich beim Eintragen von dem  $MgSO_4$  nur eine relativ sehr spärliche Fällung erhalten werden, und es war ausserdem wegen der grossen Flüssigkeitsmenge nothwendig, eine grosse Zahl von Filtern zu benutzen. Ich musste deshalb diesen Niederschlag mit den Filtern erst stark auspressen, dann in wenig Wasser zertheilen, die Lösung filtriren und zum 2. Male durch Eintragen von  $MgSO_4$  fällen. Der bei dieser 2. Ausfällung erhaltene, rein weisse Niederschlag wurde dann auf ein oder ein Paar kleine Filtern gesammelt. Nach nicht zu starkem Auspressen konnte dieser Niederschlag leicht von den Filtern abgenommen werden. Er wurde dann in eine kleine Menge Wasser gelöst, die Lösung, wenn nöthig, von Papierfetzen durch Filtration befreit, und auf diese Weise Lösungen von demjenigen Eiweissstoffe erhalten, welcher nach Burekhardt als eine Art von Serumalbumin betrachtet werden soll, während er nach meiner Ansicht nur einen Rest von nicht gefälltem Paraglobulin darstellt.

Diese Lösung wurde nun auf folgende Weise weiter untersucht. Zuerst unterwarf ich die Lösung einer neuen Dialyse, und zwar theils in offenen Dialysatoren und theils in den künstlichen Wursthülsen. Bei der Dialyse in offenen Dialysatoren erhielt ich dabei fast nie einen Niederschlag, während dies bei der Dialyse mit Wursthülsen sehr oft der Fall war. Wenn ein Niederschlag sich ausschied, wurde er weiter untersucht, wobei er regelmässig durch Löslichkeit in verdünnter Kochsalzlösung als ein Globulin sich erwies. Nach beendeter Dialyse (wenn die Lösung höchstens verschwindend kleine Spuren von Schwefelsäure enthielt) wurde, gleichgültig ob während der Dialyse eine Fällung entstanden war oder nicht, ein Theil der nöthigenfalls filtrirten Flüssigkeit

mit einem Kohlensäurestrome behandelt. Gewöhnlich wurde die Probe dabei nicht gefällt, und ebensowenig trat bei Zusatz von höchst verdünnter Essigsäure eine Trübung auf. In einigen Versuchen trat doch eine neue Fällung von Globulin auf, und in diesem Falle wurde die ganze Flüssigkeitsmenge mit Kohlensäure gefällt. Das neue Filtrat konnte dann in keiner Weise durch Dialyse, Säurezusatz oder Durchleitung von Luft, resp.  $\text{CO}_2$ , sondern nur durch Eintragen von Neutralsalzen gefällt werden.

Die erwähnten, unbedeutenden Ausscheidungen von Globulin zeigen also, dass das Serum, trotzdem dass es vorher durch Dialyse etc. möglichst vollständig von dem Globulin befreit worden war, noch merkbare Mengen von Globulin enthielt. Dass solche Ausscheidungen von Globulin nicht in allen Versuchen stattfanden, rührt nach meiner Meinung daher, dass die Globuline, wie ich wiederholt gesehen habe, gleichgültig ob man das eine oder andere Fällungsmittel benutzt, nicht immer gleich leicht aus dem Serum ausgefällt werden können. Da aber diejenigen, welche etwa der Ansicht von Burckhardt beipflichten, diese Ausscheidungen vielleicht durch die Annahme erklären wollen, dass es hier nur um einen Rest von typischem, wegen irgend eines Fehlers bei der Vorbereitung des Serums, in der Lösung zurückgebliebenen Paraglobulin sich gehandelt habe, lege ich auf die nun mitgetheilten Beobachtungen kein weiteres Gewicht und ich gehe zu demjenigen Theile meiner Versuche über, welcher in keinem einzigen Falle ein wechselndes Resultat gegeben hat, und von dessen Richtigkeit und Beweiskraft Jedermann mit der allergrössten Leichtigkeit sich selbst überzeugen kann.

Während meiner Untersuchungen über die Eiweissstoffe des Blutserums und der Transsudate hatte ich mehrmals die Beobachtung gemacht, dass es für die weitere Untersuchung nicht gleichgültig ist, ob das Globulin mit  $\text{NaCl}$  oder  $\text{MgSO}_4$  ausgefällt wird. Das mit  $\text{NaCl}$  gefällte Globulin lässt sich leichter reinigen und es wird etwas weniger leicht löslich. Dementsprechend scheidet es sich auch bei der Dialyse etwas

leichter aus (was übrigens aus mehreren Gründen zu erwarten war). Auf dieses Verhalten basirt sich folgendes Verfahren:

Nachdem die obengenannte Lösung des 2 mal mit  $MgSO_4$  gefällten Eiweiss von Neuem dialysirt und mit Kohlensäure behandelt worden war (wobei ein etwa sich ausscheidender Globulinniederschlag abfiltrirt wurde), sättigte ich dieses Filtrat mit Kochsalz in Substanz. Dabei trat in jedem Falle ein Niederschlag (1a) auf, welcher nach 12—24 Stunden abfiltrirt wurde, so dass ich ein mit  $NaCl$  gesättigtes Filtrat (1b) erhielt. Dieser, mit gesättigter  $NaCl$ -Lösung gewaschene Niederschlag wurde mit dem Filtrum zwischen Fliesspapier gepresst und dann mit dem Filtrum in Wasser zertheilt. Nach einiger Zeit wurde filtrirt und die Lösung dialysirt. Es schied sich hierbei in allen Versuchen ohne Ausnahme ein Niederschlag wenigstens innerhalb 12—24 Stunden aus, und dieser Niederschlag verhielt sich den gewöhnlichen Globulinreagentien gegenüber als gewöhnliches Paraglobulin. Dieser Niederschlag hatte doch in mehreren Fällen eine ganz bestimmte Tendenz, mit der Luft in Berührung bei anhaltenderer Dialyse sich wieder aufzulösen, was wohl auch erklären könnte, warum bei der stets mehr anhaltenden Dialyse von den  $MgSO_4$ -haltigen Lösungen eine Ausfällung sehr oft nicht stattfindet. Wurde nun dieser, bei der Dialyse entstandene Niederschlag abfiltrirt, so konnte ich mittelst Kohlensäuredurchleitung in dem Filtrate eine neue, wenn auch am öftesten nur geringfügige Fällung von Globulin hervorrufen. Wurde nochmals filtrirt, so enthielt das Filtrat, wie eine dialysirte reine Globulinlösung, nur eine geringe Menge von mit  $MgSO_4$  fällbarem Globulin. Diese Beobachtungen zeigen also, dass der mit  $NaCl$  erhaltene Niederschlag (1a) aus Globulin bestand.

Die von diesem Niederschlage abfiltrirte, mit  $NaCl$  gesättigte Flüssigkeit (Filtrat 1b) enthielt nun, wie zu erwarten war, noch eine nicht unbedeutende Menge Eiweiss, welches mit  $MgSO_4$  ausgefällt werden konnte. Ich fand es doch am besten, aus diesem Filtrate das Eiweiss nicht direkt, sondern erst nachdem das  $NaCl$  vorher durch Dialyse entfernt worden war, mit  $MgSO_4$  auszuschleiden. Der durch Sättigung mit

MgSO<sub>4</sub> erhaltene Niederschlag wurde abfiltrirt, mit dem Filtrum zwischen Papier gepresst und dann in wenig Wasser gelöst. Die Lösung wurde in künstlichen Wursthülsen einer energischen Dialyse unterworfen, und hierbei schied sich in einigen Versuchen, aber nicht in allen, wieder ein wenig Globulin aus. Gleichgültig ob bei der Dialyse etwas Globulin sich ausgeschieden hatte oder nicht, wurde nun diese, nöthigenfalls filtrirte, Flüssigkeit mit NaCl in Substanz gesättigt. Hierbei trat nun ohne Ausnahme in allen Versuchen eine neue Fällung (2<sup>a</sup>) auf, die wie die obengenannte (1<sup>a</sup>) in Wasser gelöst wurde. Bei der Dialyse von dieser neuen Lösung trat wieder eine Fällung auf, die alle Eigenschaften eines Globulins hatte.

Das von dem Niederschlage (2<sup>a</sup>) getrennte, mit NaCl gesättigte Filtrat (2<sup>b</sup>) enthielt in den meisten Fällen so wenig Eiweiss, dass es nicht weiter verarbeitet werden konnte. In ein Paar Versuchen war doch der Gehalt an Eiweiss etwas grösser, und in diesen Versuchen wurde nun das NaCl durch rasche Dialyse entfernt, die von NaCl befreite Lösung mit MgSO<sub>4</sub> gefällt, der Niederschlag in sehr wenig Wasser gelöst, diese Lösung durch Dialyse von MgSO<sub>4</sub> befreit und dann mit NaCl gefällt. Es schied sich nun wieder ein Niederschlag aus, der abfiltrirt und in Wasser gelöst wurde. In dieser Lösung trat nun bei der Dialyse eine neue Fällung auf, die in allen Beziehungen wie gewöhnliches Globulin sich verhielt, nur war sie — was ja oft mit dem ausgefallenen, einige Zeit mit Wasser in Berührung gewesenen Globulin der Fall zu sein pflegt — etwas schwerer löslich in Neutralsalzen als das typische Globulin. Das mit NaCl gesättigte Filtrat (3<sup>b</sup>) enthielt so höchst unbedeutende Mengen Eiweiss, dass an eine Verarbeitung desselben nicht gedacht werden konnte. So lange als es noch möglich war mit MgSO<sub>4</sub> etwas Eiweiss ausfällen, liess sich also die Anwesenheit von Globulin in diesem Niederschlage leicht und sicher nachweisen.

Die Ausführung dieser Versuche ist, wenn sie auch sehr zeitraubend und mühsam war, so einfach, dass Jedermann von der Richtigkeit meiner Angaben sich leicht überzeugen

kann. Damit aber der Leser im Stande gesetzt werde, auch ohne eigene Versuche den Werth meiner Beobachtungen beurtheilen zu können, will ich einige der von mir ausgeführten Versuche als Beispiele hier mittheilen.

Versuch 7. 100 ccm. Pferdeblutserum wurden genau neutralisirt und dann in künstlichen Wursthülsen gegen Wasser dialysirt. Nach 24 Stunden wurde der Globulinniederschlag abfiltrirt und das Filtrat von Neuem dialysirt. Es schied sich dabei nur eine sehr unbedeutende Fällung aus, die nach neuen 24 Stunden abfiltrirt wurde. Das neue Filtrat konnte nun weder durch Dialyse, noch durch sehr vorsichtigen Essigsäurezusatz gefällt werden. Bei Verdünnung mit 9 Vol. Wasser trübte es sich doch etwas und bei Durchleitung von Kohlensäure trat nun eine wahre Fällung auf. Diese Fällung setzte sich allmählig zum Boden, wo sie eine etwas zähe Schicht bildete. Ein Theil der Fällung blieb doch in der Flüssigkeit suspendirt, und erst durch wiederholtes Filtriren durch mehrfache Filtren aus einem dichten Papiere konnte die Flüssigkeit ganz klar erhalten werden.

Diese, ganz klare Flüssigkeit trübte sich weder bei der Dialyse, noch bei Zusatz von höchst verdünnter Essigsäure, noch bei Durchleitung von Kohlensäure. Ebenso wenig wurde sie beim Durchleiten von einem Luftstrome oder wenn sie in dünner Schicht in einem flachen Gefässe der Ruhe überlassen wurde, merkbar getrübt. Bei Zusatz von dem halben Volumen Wasser, wobei also  $\frac{1}{15}$ -Serum erhalten wurde, schien die Flüssigkeit doch schwach opalisirend zu werden, und bei anhaltendem Durchleiten von Kohlensäure wurde sie etwas trübe. Ein deutlicher Niederschlag kam doch nicht zum Vorschein, und da ich wiederholt gesehen hatte, dass in solchen Fällen ein Niederschlag erst nach mehreren Tagen sich absetzt, filtrirte ich die Flüssigkeit wiederholt durch mehrfache Filtren aus einem ungewöhnlich dichten Papiere, wobei sie zuletzt endlich klar wurde. Von dieser Flüssigkeit nahm ich dann einige kleinere Proben, welche theils mit Dialyse und theils mit Essigsäurezusatz, resp. Kohlensäuredurchleitung geprüft wurden. Diese Proben blieben bei dieser Behandlung ganz klar. Eine vierte, etwas grössere Probe wurde mit  $\frac{1}{2}$  Vol. Wasser verdünnt, und auch diese Probe trübte sich im Laufe von 12 Stunden nicht im Geringsten. Kohlensäuredurchleitung durch diese Probe blieb ebenfalls ohne Erfolg, und ich betrachtete desshalb die Ausfällung des Globulins aus dem Serum — so weit eine solche nach den älteren Methoden ausführbar ist — als eine gelungene.

Das so vorbereitete, verdünnte ( $\frac{1}{15}$ )-Serum wurde nun in einer grossen Flasche mit  $MgSO_4$  gesättigt, der Niederschlag auf mehrere Filtern gesammelt, ausgepresst, in etwa 100 ccm. Wasser gelöst, aus dieser Lösung zum 2. Male mit  $MgSO_4$  im Ueberschuss gefällt und mit

einer gesättigten Lösung des Salzes auf dem Filtrum gewaschen. Der rein weisse Niederschlag wurde darauf mit dem Filtrum zwischen Fliesspapier gepresst (jedoch nicht zu stark) und in so viel Wasser gelöst, dass das Volumen der filtrirten Lösung etwa 25 ccm. betrug. Diese Lösung wurde nun auf fünf Dialysatoren (Wursthülsen) vertheilt und einer energischen Dialyse unterworfen. Es schied sich hierbei im Laufe der ersten 24 Stunden nur eine sehr geringfügige Menge Globulin aus, und in dem Filtrate konnte in den nächsten 24 Stunden durch Dialyse keine weitere Globulinausscheidung erzeugt werden. Dieses Filtrat, welches nur Spuren von  $MgSO_4$  enthielt, wurde nun mit  $NaCl$  gesättigt, wobei in reichlicher Menge ein flockiger Niederschlag ( $1^a$ ) erhalten wurde.

Dieser Niederschlag ( $1^a$ ) wurde mit dem Filtrum stark gepresst und in Wasser gelöst. Diese Lösung dialysirte ich dann in einem offenen Dialysator unter 6-maligem Wechseln des Wassers im Laufe des Tages; und es schied sich hierbei schon innerhalb sechs Stunden ein Niederschlag aus, dessen Menge im Laufe der Nacht sich merkbar vermehrte. Dieser Niederschlag wurde nun abfiltrirt und weiter untersucht. Er löste sich in verdünnter Kochsalzlösung wie auch in sehr verdünnten Säuren oder Alkalien. Die Lösung in  $NaCl$  konnte durch Wasserzusatz und die Lösung in Alkalien durch sehr vorsichtigen Zusatz von Essigsäure bei gleichzeitiger Verdünnung mit Wasser wieder gefällt werden. Der Niederschlag verhielt sich also wie ein Globulin. Die nach beendeter Dialyse von dem Globulinniederschlage abfiltrirte Flüssigkeit gab bei Verdünnung mit Wasser und sehr vorsichtigem Zusatz von Essigsäure, wie auch beim Durchleiten von Kohlensäure eine sehr feine, in Kochsalzlösung lösliche Fällung. Die Globulinnatur des Niederschlages ( $1^a$ ) war also hiermit bewiesen.

Das von dem Niederschlage ( $1^a$ ) getrennte, mit  $NaCl$  gesättigte Filtrat ( $1^b$ ) wurde durch Dialyse (in Wursthülsen) von dem  $NaCl$  befreit und dann mit überschüssigem  $MgSO_4$  gefällt. Der mit  $MgSO_4$ -Saturation gewaschene, ziemlich spärliche Niederschlag wurde in 10 ccm. Wasser gelöst und 24 Stunden dialysirt. Es schied sich dabei kein Globulin aus. Die Lösung wurde nun mit  $NaCl$  gesättigt und es trat dabei ein neuer, flockiger Niederschlag auf ( $2^a$ ). Dieser Niederschlag wurde wie der obige ( $1^a$ ) behandelt, in Wasser gelöst und dialysirt. Es schied sich auch hier nach einigen Stunden ein flockiger, in  $NaCl$  wie in verdünnten Säuren oder Alkalien löslicher Niederschlag aus, und der Niederschlag ( $2^a$ ) bestand also ebenfalls aus Globulin. Das von ( $2^a$ ) getrennte, mit Kochsalz gesättigte Filtrat enthielt so wenig Eiweiss, dass es beim Erhitzen zum Sieden nur opalisirend wurde und bei vorsichtigem Zusatz von Essigsäure zu der siedenden Flüssigkeit nur eine äusserst spärliche Fällung gab. Die Menge des Eiweiss in dem Filtrate war also eine so geringfügige, dass es nicht weiter untersucht werden konnte.

**Versuch 8.** Es wurden 200 ccm. Rindsblutserum genau neutralisirt und auf 20 Dialysatoren (Wursthülsen) vertheilt, einer energischen Dialyse unterworfen. Nach 24 Stunden war die Ausfällung des Globulins durch Dialyse eine so vollständige, dass in dem Filtrate bei fortgesetzter Dialyse in den nächsten 24 Stunden keine weiteren Ausscheidungen erhalten werden konnten. Ebenso wenig wurde das Filtrat durch Zusatz von Essigsäure oder durch Kohlendäuredurchleitung während  $\frac{3}{4}$  Stunden getrübt. Bei Verdünnung mit 9 Vol. Wasser wurde es doch ein wenig getrübt, und diese Trübung konnte durch anhaltende Kohlendäuredurchleitung noch etwas vermehrt werden. Die nach wiederholtem Filtriren durch mehrfache Filtern klar erhaltene Flüssigkeit konnte doch in keiner Weise, sei es durch Dialyse, Essigsäurezusatz, Durchleitung von Luft resp. Kohlendäure oder durch Verdünnung mit Wasser gefällt werden.

Das so vorbereitete Serum wurde nun mit  $MgSO_4$  gesättigt und der Niederschlag wie in dem vorigen Versuche durch eine zweite Ausfällung gereinigt. Die ziemlich reichliche Fällung wurde in 50 ccm. Wasser gelöst und diese Lösung auf 10 Dialysatorschläuche vertheilt, der Dialyse unterworfen. Es schied sich dabei innerhalb 24 Stunden nur ein unbedeutender Niederschlag von in  $NaCl$  löslichem Globulin aus. Die abfiltrirte Flüssigkeit wurde wie gewöhnlich mit  $NaCl$  gefällt, der reichliche Niederschlag (1a) abfiltrirt, zwischen Fließpapier gepresst, in Wasser gelöst und diese Lösung dialysirt. Nach Verlauf von drei Stunden trat eine Fällung auf, die in den folgenden 18 Stunden nicht unbedeutend vermehrt wurde. Diese Fällung hatte alle Eigenschaften eines Globulinniederschlages. Das von ihr getrennte Filtrat gab nach Zusatz von Wasser, beim Durchleiten von Kohlendäure einen neuen aus Globulin bestehenden Niederschlag.

Das Filtrat (1b) wurde wie in dem vorigen Versuche behandelt, mit  $MgSO_4$  gefällt, die Fällung in 20 ccm. Wasser gelöst und diese Lösung auf vier Dialysatoren vertheilt. Es schied sich bei einer 24-stündigen Dialyse kein Niederschlag aus. Die Flüssigkeit gab aber nach vollständiger Sättigung mit  $NaCl$  einen flockigen Niederschlag (2a), der in Wasser gelöst wurde. Aus dieser Lösung schied sich bei der Dialyse nach etwa zwölf Stunden ein aus Globulin bestehender Niederschlag aus, und das hiervon getrennte Filtrat gab nach Verdünnung mit Wasser bei Durchleitung von Kohlendäure eine Trübung, die bei Zusatz von etwas  $NaCl$  wieder verschwand.

Das mit  $NaCl$  gesättigte Filtrat (2b) wurde wie gewöhnlich behandelt und mit  $MgSO_4$  gefällt, wobei eine nur geringfügige Fällung erhalten wurde. Diese Fällung, in 10 ccm. Wasser gelöst, wurde nun in zwei Dialysatoren gegen Wasser dialysirt und die Lösung dann mit  $NaCl$  gefällt. Trotzdem dass der Eiweissgehalt dieser Lösung im Ganzen nur ein unbedeutender war, erhielt ich doch mit  $NaCl$  einen flockigen Niederschlag (3a). Dieser Niederschlag wurde in 3 ccm. Wasser gelöst

mit diese Lösung in einem sehr kleinen, offenen Dialysator gegen Wasser dialysirt. Ich erhielt hier wiederum einen, wenn auch selbstverständlich nur sehr unbedeutenden Niederschlag, der indessen durch seine Löslichkeit in Kochsalzlösung als ein Globulinniederschlag sich erwies. Das mit NaCl gesättigte Filtrat (3<sup>b</sup>) enthielt nur Spuren von Eiweiss, und es konnte folglich nicht weiter verarbeitet werden.

So lange als es überhaupt noch möglich war, mittels  $MgSO_4$  einen Eiweissniederschlag zu erhalten, liess sich also auch in diesem Versuche die Globulinnatur dieses Niederschlages leicht zeigen. Diese beiden Versuche sind übrigens nur als Beispiele aus einer grösseren Zahl von solchen hier mitgetheilt worden; und da ich bisher in keinem einzigen Versuche ein abweichendes Resultat erhalten habe, dürfte es wohl ganz überflüssig sein, weitere detaillirte Versuche hier mitzutheilen. Ich will nur zufügen, dass ich derartige Versuche nicht nur mit Pferde- oder Rindsblutserum, sondern auch mit Transsudaten vom Menschen und 1mal auch mit Hundebutserum angestellt habe. Ueberall war das Resultat in der Hauptsache dasselbe; überall konnte ich zeigen, dass das aus einem mittels Dialyse, Kohlensäuredurchleitung und Verdünnung möglichst vollständig von Globulin befreiten Serum mit  $MgSO_4$  gefällte Eiweiss, welches von Burckhardt als einen albuminähnlichen Stoff betrachtet wurde, wirklich aus Globulin besteht.

Ich will übrigens noch einmal daran erinnern, dass ich mehrere Versuche mit Pferdeblutserum aus dem Grunde nicht vollführen konnte, weil es mir nicht möglich war, aus diesem Serum durch Dialyse, Verdünnung mit Wasser, Kohlensäuredurchleitung etc. das Globulin zu entfernen, ohne gleichzeitig das Serum so äusserst stark mit Wasser zu verdünnen, dass eine weitere Verarbeitung nicht möglich wurde. Bei Versuchen mit Rinds-, wie auch mit Hundebutserum war es dagegen im Allgemeinen weit leichter, das neutralisirte Serum mittels Dialyse, Verdünnung mit Wasser und darauffolgende Kohlensäuredurchleitung so weit von Globulin zu befreien, dass das neue Filtrat bei weiterer Verdünnung mit Zusatz von Säuren etc. gar nicht weiter getrübt wurde. Da die Versuche mit Rindsblutserum also im Allgemeinen weniger

mühsam und leichter auszuführen sind als diejenigen mit Pferdeblutserum, habe ich geglaubt, dass diese Bemerkungen für diejenigen, welche meine Versuche vielleicht wiederholen wollen, nicht ganz unwillkommen sein sollten.

Durch die, in den obigen Versuchen 7 und 8 ausführlich mitgetheilte Versuchsanordnung kann man also leicht zeigen, dass derjenige Eiweissniederschlag, der in einem nach den älteren Methoden so weit wie möglich von Globulin befreiten Serum mit  $MgSO_4$  erhalten wird, wahres Globulin enthält. Ich stellte mir nun die Frage, ob dieses Globulin mit dem Paraglobulin identisch oder von diesem Eiweissstoffe wesentlich verschieden sei. Von anderen verwandten Globulinen unterscheidet sich das Paraglobulin bekanntlich durch die Gerinnungstemperatur, die unvollständige Fällbarkeit mit  $NaCl$  und endlich auch durch die spezifische Drehung. Die letztere konnte nun in meinen Versuchen nicht ganz genau bestimmt werden, denn das fragliche Globulin konnte ich nur schwierig in genügend grosser Menge erhalten. Ich habe doch 2 mal die spezifische Drehung zu ermitteln versucht und dabei die Zahlen  $-47,2^\circ$ , resp.  $48^\circ$  erhalten, was ja recht gut mit der von Frédericq (für das direkt aus dem Serum mit  $MgSO_4$  gefällte Globulin) gefundenen Mittelzahl  $-47,8^\circ$  stimmt. Da ich indessen einerseits nur 2 mal die spezifische Drehung bestimmte und andererseits nur mit kleinen Substanzmengen arbeiten konnte, will ich kein grosses Gewicht auf diese Zahlen legen, wenn sie auch für die Identität dieses Eiweissstoffes mit dem typischen Serumglobulin sprechen.

Hinsichtlich der zwei anderen Eigenschaften stimmt dagegen das unter gewöhnlichen Verhältnissen nur mit  $MgSO_4$  fällbare Eiweiss mit dem typischen Paraglobulin wohl überein. Von überschüssigem  $NaCl$  wird es nämlich nur unvollständig gefällt, und die Gerinnungstemperatur, die ich in mehreren Fällen bestimmt habe, liegt für die  $NaCl$ -haltige Lösung bei etwa  $+75^\circ C$ .

Dasjenige Eiweiss des Blutserums, welches bei der gewöhnlichen Versuchsanordnung weder durch Dialyse noch durch

Säurezusatz, sondern erst durch Eintragen von Magnesiumsulfat gefällt wird, und welches von Burekhardt als ein mit den Albuminen verwandtes Eiweiss betrachtet wurde, besteht also nicht nur — wie ich schon vor mehreren Jahren behauptet habe — aus einer Globulinsubstanz, sondern dieses Globulin scheint sogar mit dem typischen Paraglobulin identisch zu sein, wenn auch die Löslichkeits-, resp. Fällbarkeitsverhältnisse in Folge besonderer Umstände etwas andere sind.

Wenn also über die Globulinnatur des von mir untersuchten Eiweiss kein Zweifel mehr bestehen kann, so giebt es doch noch eine Einwendung, die nicht ohne Weiteres zurückzuweisen ist. Ich gedenke hier der von einer Seite gemachten Annahme, dass scheinbar sehr geringe Einflüsse von Salzen das Serumalbumin in Serumglobulin zu verwandeln fähig sein sollen, und dass dementsprechend ein Theil des aus dem Serum mit  $MgSO_4$  fällbaren Globulins in Folge der chemischen Prozeduren aus dem Serumalbumin entstanden sei. Ich habe deshalb auch diese Möglichkeit zum Gegenstande einer besonderen Untersuchung gemacht und dabei von der unerwartet grossen Widerstandsfähigkeit des Serumalbumins gegen nicht zu eingreifende chemische Agentien mich überzeugen können.

Dass das Serumalbumin von Salzen allein nicht merkbar verändert wird, habe ich schon vor mehreren Jahren in meinem Aufsätze über das Paraglobulin zur Genüge gezeigt, und gerade auf diesem Verhalten habe ich sogar eine Methode zur Reindarstellung des Serumalbumins basirt. In den oben mitgetheilten Versuchen wurde indessen das Serum vor dem Sättigen desselben mit  $MgSO_4$  mit Kohlensäure behandelt und bei dem Eintragen des Salzes enthielt es noch ziemliche Mengen von diesem Gase. Man könnte deshalb vielleicht annehmen wollen, dass das Serumalbumin, wenn es auch durch Salze allein nicht verändert wird, durch die combinirte Wirkung der Kohlensäure und des Salzes doch zum Theil in Serumglobulin verwandelt werde, und ich musste also diese Möglichkeit zum Gegenstand einer besonderen Untersuchung machen.

Die zu diesen Untersuchungen verwendeten Lösungen von Serumalbumin stellte ich in einigen Fällen nach der von Starke und mir<sup>1)</sup> angegebenen Methode dar. In den meisten Fällen verfuhr ich doch in der Weise, dass ich das Serum mit  $MgSO_4$  bei  $+30^\circ C.$  sättigte, dann durch Abkühlen des Filtrates auf Zimmertemperatur das im Ueberschuss gelöste Salz auskrystallisiren liess und endlich die durch Ausfrieren von Salz weiter befreite und etwas concentrirter gewordene Lösung dialysirte. Wenn die Lösung dabei während der Dialyse stark verdünnt worden war, wurde sie dann bei etwa  $40^\circ C.$  durch Hinüberleiten eines Stromes von getrockneter Luft rasch genügend concentrirt.

Durch die so gewonnene Lösung von Serumalbumin leitete ich dann einen Kohlensäurestrom während höchstens zwei Stunden; und dabei blieb sie — wenn das Globulin vorher ganz vollständig entfernt worden war — ganz klar und unverändert. Es wurde also aus dem Serumalbumin kein mit Kohlensäure fällbares Globulin gebildet, und wenn ich dann, nach dem Entweichen der überschüssigen Kohlensäure, diese Lösung mit  $NaCl$  oder  $MgSO_4$  sättigte, trat keine Spur einer Fällung oder Trübung auf. Die Kohlensäure allein vermag also nicht das Serumalbumin in eine, durch  $NaCl$  oder  $MgSO_4$  fällbare Substanz überzuführen, und davon mir in den oben mitgetheilten Versuchen (7 und 8) in dem mit  $MgSO_4$  erhaltenen Niederschlage nachgewiesene Globulin konnte also kein aus dem Serumalbumin in Folge der Kohlensäuredurchleitung entstandenes Umwandlungsprodukt sein.

Dass das Serumalbumin ebensowenig durch anhaltende Dialyse in Globulin umgewandelt wird, habe ich in meinem ersten Aufsätze über Paraglobulin schon bewiesen, und auf diesem Verhalten gründet sich ja die gewöhnliche Methode zur Reindarstellung des Serumalbumins. Dass auch ein vorheriges Behandeln der Albuminlösung mit Kohlensäure auf ihr Verhalten bei der Dialyse ganz ohne Einfluss ist, habe ich durch besondere Versuche gefunden.

<sup>1)</sup> Jahresbericht für Thierchemie. Bd. 41, S. 17.

Die Widerstandsfähigkeit des Serumalbumins gegen Kohlensäure führte mich weiter zu einer besonderen Prüfung von dem Verhalten dieses Eiweissstoffes zu anderen Säuren, wie Essigsäure und Chlorwasserstoffsäure, und ich wurde dabei von der unerwartet grossen Resistenz des Serumalbumins gegen Säuren im Allgemeinen sehr überrascht. So fand ich z. B., dass eine mit 0,5—1% Essigsäure versetzte Serumalbuminlösung mehrere Wochen bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden konnte ohne eine merkbare Umwandlung in Globulin oder Acidalbuminat zu erfahren. Bei der Neutralisation trat keine Fällung oder Trübung auf und durch Eintragen von überschüssigem NaCl oder MgSO<sub>4</sub> konnte die Lösung nicht im Geringsten gefällt werden. Auch nach Zusatz von 0,2—0,5% HCl hielt sich eine Lösung von Serumalbumin tagelang ganz unverändert; es konnte keine Spur von Globulin oder Acidalbuminat nachgewiesen werden.

Um die combinirte Wirkung von Säuren und Salzen auf das Serumalbumin zu studiren, versetzte ich mit MgSO<sub>4</sub> gesättigte Lösungen von Serumalbumin mit Säuren in wechselnden Mengen, und ich fand dabei, dass bei einem Zusatz von 0,5—0,75% Essigsäure zwar eine reichliche Fällung von Serumalbumin stattfand, dass aber diese Fällung nach 24 bis 48 Stunden noch aus unverändertem Serumalbumin bestand. Wurde der Niederschlag nach dieser Zeit auf Filtern gesammelt, stark gepresst, in Wasser gelöst und die neutralisirte Lösung dann durch Dialyse von dem Salze befreit, so trat während der Dialyse gar keine Fällung auf und ebensowenig konnte in der neutralisirten Lösung durch Sättigung derselben mit NaCl oder MgSO<sub>4</sub> eine Fällung erzeugt werden. Die allgemein verbreitete Ansicht, dass schon geringe Mengen von Säure hinreichen, um das Serumalbumin in der mit einem Neutralsalze gesättigten Lösung in Acidalbumin überzuführen, ist also eine unrichtige. Aus einer globulinfreien Albuminlösung fällt unter diesen Verhältnissen nur unverändertes Serumalbumin aus, und wenn der Niederschlag auch etwas Syntonin enthalten würde, rührt dies von

einer Verunreinigung mit Globulin her, denn dieses wird anscheinend leichter in Acidalbuminat umgewandelt.

Die Widerstandsfähigkeit des Serumalbumins gegen die combinirte Einwirkung von Säuren und Salzen führte mich auch dahin zu untersuchen, ob nicht auf Grundlage dieses Verhaltens eine neue Methode zur Reindarstellung des Serumalbumins in grösseren Mengen versucht werden könnte. Dieser Versuch gelang nun auch sehr gut; da ich aber die ganze Frage von dem Verhalten des Serumalbumins zu verdünnten Säuren allein, wie auch zu Säuren bei Gegenwart von Salzen einem meiner Schüler zur weiteren Ausarbeitung überliefert habe, will ich hier auf diese Verhältnisse nicht des Näheren eingehen. Ich will nur die Aufmerksamkeit darauf lenken, dass ganz reine Resultate nur in dem Falle erhalten werden können, wenn die Ausscheidung der Globuline eine ganz vollständige ist.

Ich bemerke dies mit besonderer Rücksicht auf die Schwierigkeiten, mit welchen ein ganz vollständiges Ausfällen der Globuline aus dem Pferdeblutserum bisweilen verknüpft ist. Schon vor mehreren Jahren habe ich in meinem Aufsätze über das Paraglobulin<sup>1)</sup> die Bemerkung gemacht, dass ein ganz vollständiges Ausfällen der Globuline mit  $MgSO_4$  aus dem Pferdeblutserum bei Zimmertemperatur gar nicht immer gelingt; und ich kann zufügen, dass es auch Fälle giebt, wo eine erschöpfende Ausfällung der Globuline nicht einmal durch Sättigen des Serums mit  $MgSO_4$  bei  $+ 30^\circ C.$  zu erzielen ist. In solchen Fällen kann man bisweilen, wenn das Filtrat erst durch Abkühlen auf Zimmertemperatur und dann durch Ausfrieren von dem überschüssigen Salze befreit worden ist, nach anhaltender energischer Dialyse oder jedenfalls bei darauffolgender, anhaltender Kohlensäuredurchleitung, resp. Zusatz von  $NaCl$  oder  $MgSO_4$  eine Spur einer Globulinfällung erhalten. In solchen Fällen erhält man auch durch Zusatz von  $\frac{1}{2}$ —1% Essigsäure zu dem mit  $MgSO_4$  gesättigten Serumfiltrate einen Niederschlag, der nicht aus ganz reinem Serumalbumin besteht, sondern

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv, Bd. 17.

auch Spuren von Globulin, resp. Acidalbuminat enthält. Immer handelt es sich doch hier nur um eine sehr unbedeutende Verunreinigung, welche zwar die Reinheit der Resultate etwas beeinträchtigen, aber doch nie das Hauptergebniss verdecken kann. Arbeitet man dagegen mit Rindserum, so gelingt die vollständige Ausscheidung der Globuline mit  $MgSO_4$  im Allgemeinen weit leichter, und dementsprechend erhält man auch weit leichter ganz reine Resultate.

Die nun mitgetheilten Beobachtungen über das Serumalbumin zeigen also, dass dasjenige Globulin, welches ich aus dem mit  $MgSO_4$  erzeugten Niederschlage durch Dialyse, Ausfällung mit  $NaCl$  etc. isoliren konnte, kein in Folge der chemischen Proceduren entstandenes Umwandlungsprodukt des Serumalbumins sein kann; und ich muss also behaupten, dass es in meinen Versuchen sich also wirklich um ein im Blutserum von Anfang an vorhandenes Globulin gehandelt hat.

Wollte man dieser meiner Behauptung nicht beipflichten, so würde, da das Globulin jedenfalls nicht aus Serumalbumin entstanden sein kann, nur die Annahme übrig bleiben, dass das von mir in dem Magnesiumsulfatniederschlage nachgewiesene Globulin aus einem anderen, nicht der Albumin-, sondern der Globulingruppe angehörenden Stoffe — einem Globulinogen — entstanden sei. Gegen eine solche Annahme will ich nur einwenden, dass sie einerseits eine reine Hypothese ohne irgend welche thatsächliche Begründung ist, und dass sie andererseits ganz überflüssig ist, da die beobachteten Erscheinungen ohne dieselbe ebenso gut erklärt werden können. Wollte man eine solche Hypothese aufstellen, so ist damit übrigens selbstverständlich zugestanden, dass das nach Burckhardt nur mit  $MgSO_4$  fällbare Eiweiss jedenfalls nicht zu der Albumin-, sondern zu der Globulingruppe gerechnet werden muss.

Zuletzt wollen wir nun über die in diesem Aufsätze mitgetheilten Versuchsergebnisse einen Ueberblick nehmen.

Zuerst finden wir dann, dass das typische, nach den älteren Methoden aus dem Serum ausgefällte und durch wieder-

holtes Ausfällen und Wiederauflösen gereinigte Paraglobulin in Wasser nicht ganz unlöslich zu sein scheint, und dass man dementsprechend von diesem Stoffe leicht Lösungen erhält, die weder durch Dialyse, noch durch Zusatz von Essigsäure, resp. Kohlensäuredurchleitung vollständig gefällt werden können.

Schon auf Grund dieses Verhaltens könnte man fast mit Bestimmtheit voraussagen, dass eine erschöpfende Ausfällung des Globulins aus dem Serum nach diesen Methoden nicht möglich sein soll. Da nun in dem Serum besondere, globulinlösende Stoffe vorkommen, könnte man weiter erwarten, dass in ihm verhältnissmässig reichliche Mengen von Globulin bei der Dialyse, resp. bei Zusatz von Säuren, in Lösung bleiben würden; und da das Globulin unter allen Umständen von  $MgSO_4$  gefällt werden kann, musste man dementsprechend in einem durch Dialyse, resp. Säurezusatz erschöpfend gefällten Serum durch Eintragen von  $MgSO_4$  noch eine reichliche Ausscheidung von Globulin erwarten können.

Diese Voraussetzungen sind nun auch in der That durch die Versuche bestätigt worden. Es hat sich nämlich herausgestellt, dass die Dialyse, selbst wenn sie mit Neutralisation des Serums oder Säurezusatz combinirt wird, eine zur vollständigen Ausfällung der Globuline lange nicht hinreichende Methode ist, insofern als ein auf die obige Weise erschöpfend gefälltes Serum oft durch Verdünnung mit Wasser allein oder durch Verdünnung mit Wasser und Kohlensäuredurchleitung einen mehr oder weniger reichlichen Niederschlag von Serumglobulin geben kann. Arbeitet man mit Pferdeblutserum, ist dies etwas sehr gewöhnliches; und es ereignet sich sogar bisweilen, dass ein durch Dialyse nach vorausgegangener Neutralisation möglichst erschöpfend gefälltes Serum erst dann aufhört bei wiederholter Verdünnung mit Wasser und Kohlensäuredurchleitung gefällt oder getrübt zu werden, wenn die Verdünnung so weit getrieben worden ist, dass das Paraglobulin wegen seiner nicht ganz vollständigen Unlöslichkeit in Wasser dabei in Lösung bleiben muss. Als Methode zur quantitativen Bestimmung der Globuline kann die Dialyse

schon aus diesen Gründen nicht geeignet erscheinen, und den nach dieser Methode ausgeführten Bestimmungen kann man also keinen grösseren Werth beimessen.

Die Beobachtung von Burckhardt, dass der, in einem durch Dialyse und Säurezusatz von Globulin möglichst befreiten Serum, mit  $MgSO_4$  erzeugte Niederschlag in Wasser gelöst bei der Dialyse in gewöhnlichen, offenen Dialysatoren keinen Globulinniederschlag giebt, ist eine ganz richtige. Diese Beobachtung kann doch nicht als ein Beweis gegen die Globulinnatur dieses Niederschlages gelten, denn erstens ist es nicht selten möglich durch recht energische Dialyse in Pergamentpapierschläuchen einen Globulinniederschlag in solchen Lösungen zu erzeugen, welche bei der Dialyse in offenen Dialysatoren nicht getrübt werden, und andererseits lässt sich die Globulinnatur dieses Niederschlages direkt zeigen.

Zu dem Ende ist es, wie oben gezeigt worden ist, nur nöthig, die dialysirte Lösung des  $MgSO_4$ -Niederschlages mit  $NaCl$  zu fällen, den Niederschlag in Wasser zu lösen und diese Lösung zu dialysiren. Es scheidet sich dabei regelmässig ein Globulinniederschlag aus, und aus dem mit  $NaCl$  gesättigten Filtrate können neue Mengen von Globulin gewonnen werden. So lange als es überhaupt noch möglich ist, mit  $MgSO_4$  einen Niederschlag zu erzeugen, so lange kann man auch auf die in den Versuchen 7 und 8 angegebene Weise zeigen, dass dieser Niederschlag aus Globulin besteht, während der Nachweis von anderen Eiweisskörpern darin mir nicht gelungen ist. Dieses Globulin stimmt bezüglich der Gerinnungstemperatur und der unvollständigen Fällbarkeit für  $NaCl$  mit dem typischen Paraglobulin überein, womit doch weder die Identität beider bewiesen, noch die Möglichkeit, dass der Niederschlag ein Gemenge von zwei oder mehreren Globulinen sei, in Abrede gestellt sein soll. Dass dieses Globulin schon von vorneherein in dem Serum vorhanden gewesen und nicht etwa aus dem Serumalbumin in Folge der chemischen Eingriffe entstanden sei, geht aus der ausserordentlich grossen Widerstandsfähigkeit des Serumalbumins

gegen die Einwirkung von Säuren und Neutralsalzen, wie auch gegen eine anhaltende Dialyse zur Genüge hervor.

Aus dem nun Gesagten geht also die Thatsache hervor, dass nicht sämtliches in dem Serum enthaltene Globulin dieselbe Fällbarkeit besitzt. Ein Theil davon scheidet sich bei der Dialyse, wie bei Zusatz von Säuren und Verdünnung mit Wasser, verhältnissmässig leicht aus, und dieser Theil wird als typisches Paraglobulin betrachtet. Ein anderer Theil dagegen scheidet sich bei einer solchen Versuchsanordnung gewöhnlich nicht aus, während er von  $MgSO_4$  gefällt werden kann. Dieser Theil des Serumglobulins ist es, welcher wegen seiner Nichtfällbarkeit bei der gewöhnlichen Versuchsanordnung von Burekhardt als ein albuminähnlicher Stoff betrachtet wurde.

Die Gründe, warum ein Theil der Globuline aus dem Serum durch Dialyse, resp. Säurezusatz verhältnissmässig leicht, ein anderer Theil dagegen sehr schwierig oder nicht gefällt wird, könnten mehrere sein. Einerseits könnte der leichter fällbare Theil als freies oder nur an Alkali gebundenes Globulin in dem Serum enthalten sein, während der Rest in einer festeren, durch Dialyse oder Säurezusatz nicht ohne Weiteres zerlegbare Verbindung sich vorfände. Andererseits könnte man aber auch daran denken, dass die bisher nicht näher studirten, paraglobulinlösenden Stoffe oder andere in dem Serum vorhandenen Substanzen die Ausfällung eines Theiles der Globuline verhindern könnten, so dass stets ein nur durch Eintragen von  $MgSO_4$  fällbarer Theil der Globuline in Lösung zurückbliebe. Für die eine, wie für die andere Annahme sprechen mehrere Beobachtungen; da ich aber bisher keine eingehendere Untersuchungen über diese Möglichkeiten angestellt habe, finde ich es nicht passend, bei dieser Gelegenheit auf diese Frage ausführlicher einzugehen.

Die Hauptaufgabe der nun mitgetheilten Untersuchungen war nur die, zu prüfen, in wie weit das  $MgSO_4$  als Mittel zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Serumalbumin und Globulinen dienen könne, und in Bezug auf

diese Frage hat als wesentlichstes Resultat dieser Untersuchungen Folgendes sich ergeben:

1. Das  $MgSO_4$  ist das einzige, bisher bekannte Mittel, welches eine ganz vollständige Ausfällung der Globuline aus dem Serum oder einem Transsudate gestattet, während bei der Dialyse, wie auch bei den übrigen, älteren Verfahrungsweisen stets reichliche Mengen von Globulin in Lösung bleiben. Wenn es sich darum handelt, die Globuline von anderen Eiweissstoffen zu trennen und aus einer Flüssigkeit vollständig zu entfernen, ist das  $MgSO_4$  also das einzige, zuverlässige Mittel.
2. Von dem typischen Serumalbumin wird von  $MgSO_4$  bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion nicht eine Spur mit ausgefällt, während alle andere, in dem Serum oder in den Transsudaten enthaltenen, coagulablen Eiweissstoffe dadurch vollständig ausgefällt werden. Das nach den älteren Methoden dargestellte Serumalbumin ist dagegen stets von nicht unbedeutenden Globulinmengen verunreinigt, und wenn es sich darum handelt, das Serumalbumin ganz vollständig von anderen Eiweissstoffen zu trennen und in reinem Zustande darzustellen, ist also das  $MgSO_4$  das einzige bisher bekannte, ganz zuverlässige Mittel.
3. Da das typische Serumalbumin von  $MgSO_4$  gar nicht gefällt wird und seiner ganzen Menge nach aus dem Filtrate durch Erhitzen ausgefällt werden kann oder auch als Differenz zwischen der Gewichtsmenge des Totaleiweiss und des Magnesiumsulfatniederschlages sich berechnen lässt, muss die Brauchbarkeit des Magnesiumsalzes zur quantitativen Bestimmung des Serumalbumins über jeden Zweifel erhaben sein.
4. Da man jetzt in dem Blutserum, resp. den Transsudaten, ausser dem typischen Serumalbumin und den zweifelhaften Spuren von Peptonen keine anderen Eiweissstoffe als die Globuline kennt, und da man weiter, trotz besonderen darauf gerichteten Untersuchungen in dem  $MgSO_4$ -Niederschlage bisher nichts anderes als Globuline gefunden hat, muss man diesen Niederschlag bis auf Weiteres als nur aus Globulinen bestehend betrachten. So lange die Gegenwart von anderen Eiweissstoffen in diesem Niederschlage noch nicht bewiesen worden ist, muss also das  $MgSO_4$  als das einzige, zuverlässige Mittel zur quantitativen Bestimmung der Globuline betrachtet werden.

Nachdem ich nun über die Brauchbarkeit der Magnesiumsulfatmethode mich ausgesprochen habe, bleibt es mir nur übrig, noch eine kleine Bemerkung anderer Art hinzuzufügen. Durch einen Aufsatz von R. Lepine «Sur quelques

points de la pathogénie de l'albuminurie», revue mensuelle de médecine et de chirurgie, p. 337, ist meine Aufmerksamkeit auf die Arbeiten von Denis besonders gerichtet worden, und seitdem nun mehrere dieser Arbeiten mir zugänglich sind, habe ich gefunden, dass das  $MgSO_4$  schon von Denis zur quantitativen Bestimmung der Globuline verwendet worden ist. Es ist freilich wahr, dass Denis das Magnesiumsulfat in anderer Weise als ich zur quantitativen Bestimmung der Globuline verwendete; aber dies ändert doch in der Hauptsache nichts, und mit vollem Rechte muss man Denis als Urheber der Magnesiumsulfatmethode für quantitative Globulinbestimmungen betrachten.