

Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweisskörper mit besonderer Rücksicht auf die Milch¹⁾.

Von

John Sebellien.

(Der Redaction zugegangen am 11. Juli 1888.)

1. Fällungsmittel für Eiweisskörper im Allgemeinen.

In einer früheren Arbeit²⁾ habe ich zwei verschiedene Eiweisskörper, welche sich neben dem Kasein in der Milch befinden, isolirt und deren Existenz nachgewiesen. Bei den jetzt zu beschreibenden Untersuchungen habe ich gesucht, die wichtigsten der vorhandenen Methoden für quantitative Eiweissbestimmungen einer experimental-kritischen Prüfung zu unterziehen, und daneben versucht, eine leichte und brauchbare Methode für die genaue Trennung der verschiedenen Eiweisskörper der Milch zu erhalten.

Für die Bestimmung der Totaleiweissmenge ist eine grosse Anzahl Methoden vorgeschlagen, wovon jedoch mehrere auf nicht hinreichend gründlich untersuchter Basis ruhen. Bei der vorliegenden Arbeit habe ich mich besonders bemüht, theils die Vollständigkeit der Fällungsmethoden für verschiedene Eiweisskörper in reinem Zustande, d. h. frei sowohl von anderen Eiweisssubstanzen, wie von sonstigen fremden stickstoffhaltigen Bestandtheilen zu prüfen, theils zu untersuchen, in wiefern die Gegenwart des einen Eiweiss-

1) Nach dem dänischen Original in «Oversigt af det kgl. danske Videnskabernes Selskabs Forhandlinger, 1888».

2) Diese Zeitschrift, 1885, Bd. IX, S. 445.

körpers die Fällung des anderen beeinflusst. Es lässt sich ja nämlich der Fall denken, dass die eine Eiweisssubstanz die vollständige Ausfällung der anderen hindern kann, oder auch, dass erstere selbst mit niedergerissen wird, wenn sie sich mit der anderen in einer Lösung zusammen befindet.

Nur in einzelnen Fällen habe ich das Gewicht des ausgeschiedenen Niederschlages und dessen mehr oder weniger constante Zusammensetzung bestimmt, denn es scheint mit hinreichender Deutlichkeit hervorzugehen sowohl aus den Untersuchungen Anderer, wie aus meinen eigenen Versuchen über den betreffenden Gegenstand, dass die Verbindungen, welche die Eiweisskörper mit ihren Fällungsmitteln eingehen, von gar zu variabler Zusammensetzung sind, als dass dieselbe als Grundlage für eine quantitative Bestimmungsmethode dienen kann. Auch möge es nach der Bequemlichkeit, womit man heutzutage nach Kjeldahl's Methode Stickstoffbestimmungen in grosser Anzahl und mit grosser Genauigkeit vornehmen kann, vortheilhaft sein, für die quantitative Bestimmung eines eiweisshaltigen Niederschlages, die Menge des Eiweisskörpers hierin mittelst einer in dem ungewogenen Niederschlage vorgenommenen Stickstoffbestimmung zu berechnen. Insofern es sich um das Kasein und Albumin der Milch handelt, kann man mit grosser Sicherheit deren Stickstoffgehalt zu 15,7% setzen, wodurch der entsprechende «Factor» 6,37 wird. Berechnet man in dieser Weise die Eiweissmenge aus dem «eiweissartigen Stickstoff», umgeht man also die vielen unbequemen und zeitraubenden Wägungen der Filtren und Niederschläge, sowie auch das oft langwierige Trocknen derselben.

Als Untersuchungsmaterial wurden verwendet theils Lösungen von reinem Kasein, welches 3 mal mit Essigsäure nach Hammarsten's¹⁾ Methode gefällt war, darauf in Minimum von Alkali gelöst und endlich mit einigen Tropfen einer verdünnten Chlorcalciumlösung und einigen Tropfen einer ebenfalls verdünnten Lösung von phosphorsaurem Natron vor-

¹⁾ Beiträge z. Kenntniss des Kaseins u. d. Wirkung des Labfermentes. Upsala 1877.

sichtig vermischt, um das Kasein unter ähnlichen Verhältnissen zu erhalten (als «Kaseincalciumphosphat») als es in der Milch vorkömmt; — theils Lösungen von Laktalbumin in solcher Weise dargestellt, wie ich es früher¹⁾ beschrieben habe; — theils Lösungen von reinem Ovalbumin, welches aus verdünntem und neutralisirtem Hühnereiweiss dargestellt wurde, indem letzteres erst durch Sättigung mit Magnesiumsulfat von Globulinsubstanzen befreit wurde, darauf das Filtrat mit Essigsäure gefällt und der Niederschlag in gleicher Weise wie das Laktalbumin behandelt (Filtriren und Abpressen, Lösung in wenig Wasser, Neutralisirung mit Natronlauge und Dialyse).

Es wäre vielleicht Ursache gewesen, die Peptone mehr gründlich in das Bereich dieser Untersuchungen hineinanzuziehen, als jetzt geschehen ist; so lange aber der Begriff dieser Körper noch nicht als unbestreitsbar festgeschlagen zu betrachten ist, weder in Beziehung auf deren elementare Zusammensetzung, noch auf deren Eigenschaften, möchte es zweckmässig scheinen, die fernere Behandlung von dem analytischen Verhalten der Peptonsubstanzen aufzuschieben, bis mehr Einigkeit darüber gewonnen ist, was eigentlich unter «Peptone» zu verstehen ist. Vergleichshalber habe ich jedoch ein paar einzelne Versuche mitgenommen, welche mit verschiedenen Präparaten, durch Pepsindigestion von Eiweisskörpern (theils Kasein, theils Ovalbumin) erhalten, angestellt sind.

Wo es sich um die Bestimmung der gesammten Eiweissmenge der Milch handelt, wird unsere Aufmerksamkeit in erster Reihe auf die Lösungen schwerer Metallsalze, Gerbsäure und Phosphorwolframsäure als die meist brauchbaren Fällungsmittel, hingeleitet. Sie gehören zu den feinsten Eiweissreagentien, und es schien daher der Mühe werth, zu untersuchen, wie vollständig ihre fällenden Eigenschaften sind.

Ritthausen schlug vor²⁾, die totale Eiweissmenge auszufällen durch Zusatz einer Lösung von Kupfersulfat zur verdünnten Milch und darauf von so viel Alkalilauge; als die Mischung vertragen kann; ohne alkalisch zu werden. Der

1) A. a. O., S. 454.

2) Journal für praktische Chemie [2], Bd. 15, S. 329.

durch Decantation gewaschene Niederschlag wird auf ein gewogenes Filtrum gesammelt, wonach das Fett mittelst Aether entfernt wird. Der trockne Rückstand wird darauf gewogen und geglüht und der Gewichtsverlust als Eiweisssubstanz berechnet.

Ritthausen überzeugte sich, dass die Filtrate von solchen Fällungen so gut wie stickstofffrei waren, denn sie enthielten durchschnittlich nur 0,02% Stickstoff. Die Fällung war also als vollständig zu betrachten.

Die Methode ist jedoch mit dem Fehler behaftet, dass das Kupferoxydhydrat, welches mit den Eiweisskörpern gemeinsam ausfällt, nicht alles Hydratwasser beim Trocknen bei 125° C., sondern erst beim Glühen abgibt, wodurch das Hydratwasser also mit zur Eiweisssubstanz gerechnet wird.

Stenberg¹⁾ hat diesen Fehler nachgewiesen; er fand aber auch, dass die Methode nichtsdestoweniger gute Resultate liefert, wenn die zur Analyse verwendete Milchmenge wenigstens 0,6 gr. Eiweisssubstanz enthält und das Verhältniss zwischen der angewendeten Kupferoxydmenge und der Eiweisssubstanz nicht ausserhalb der Grenzen $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{3,5}$ variirt. Hierbei wird aber alsdann gefordert, dass die zu bestimmende Eiweissmenge im Voraus ungefähr bekannt ist; ausserdem hat die Methode die Misslichkeit, dass man bei den Filterwägungen, die hier bei ziemlich hohen Temperaturen vorzunehmen sind, schwerlich constantes Gewicht erhält.

Sieht man davon ab, dass man mit dem Alkalizusatz etwas vorsichtig verfahren muss, um dass nicht ein Ueberschuss hiervon die ausgeschiedene Eiweisssubstanz wieder auflösen soll, welche Vorsicht übrigens ganz leicht einzuhalten ist²⁾, so geschieht die Bildung und das Absetzen des Niederschlages so schnell und vollständig, dass die Methode sehr geeignet ist, selbst für grössere Serienuntersuchungen mit vielen Analysen, so wie es bei Arbeiten mit praktisch physiologischem oder technischem Zwecke oft der Fall ist. Es wird aber auch

1) Nordiskt medicinskt Arkiv, 1882.

2) Jeder cbcm. Kupferlösung (69,278 gr. krystallisirtes Sulfat = 1000 cbcm.) fordert ca. 4 cbcm. $\frac{1}{10}$ norm. Natronlauge, um neutrale Reaction zu geben.

dann, aus den obengenannten Gründen, vortheilhaft sein, anstatt den Niederschlag zu wägen, eine Stickstoffbestimmung auf demselben vorzunehmen, wobei es also auch unnöthig wird, den Niederschlag zu trocknen oder zu entfetten¹⁾).

Es folgen unten einige Beispiele solcher Bestimmungen, wo die Stickstoffbestimmung, sowie überhaupt sämtliche Stickstoffbestimmungen dieser Arbeit nach Kjeldahl's unveränderter Methode²⁾ vorgenommen wurde, doch so, dass das Ammoniak in $\frac{1}{10}$ oder $\frac{1}{20}$ norm. Schwefelsäure aufgefangen wurde und dann entweder mit $\frac{1}{10}$ norm. Natron- oder $\frac{1}{10}$ norm. Barytlauge titirt wurde, unter Verwendung von Lakmus oder Rosolsäure als Indicator. Die Stickstoffmenge des Filtrums wurde mehrere mal besonders bestimmt und machte für die von mir verwendeten Filtren 0,1 cbcm. $\frac{1}{10}$ norm. N pr. Stück aus, welche Correction in allen Analysen eingeführt ist.

1. Lösung von reinem Kasein mit Calciumphosphat (Kaseincalciumphosphat).

10 cbcm. gab 15,8 cbcm. $\frac{1}{10}$ norm. N = 0,02212 gr., α : 0,22% N.

10 cbcm. mit 4 Volumen Wasser verdünnt, darauf mit Kupfersulfat und Natronlauge bis beinahe neutrale Reaction gefällt. — Der Niederschlag gab 15,7 cbcm. $\frac{1}{10}$ norm. N = 0,02198 gr., α : 0,220% N.

Das Filtrat wurde in einem Kjeldahl'schen Kölbchen eingedunstet und in gewöhnlicher Weise behandelt, zeigte sich aber absolut stickstofffrei.

2. Reines Kasein, in Kalkwasser gelöst, mit Phosphorsäure neutralisirt.

4,977 gr. Lösung enthielt 8,7 cbcm. $\frac{1}{10}$ norm. N = 0,01218 gr., α : 0,245% N.

4,925 gr. Lösung wurde mit ein paar Tropfen Kupferlösung versetzt, darauf titrirter Natronlauge bis zur Entfärbung der Lösung. — Der Niederschlag enthielt 8,6 cbcm. $\frac{1}{10}$ norm. N = 0,01204 gr., α : 0,244% N.

1) Für die Fettbestimmung wird es sich gewöhnlich lohnen, diese in einer besonderen Portion nach den von mir früher beschriebenen Storch'schen Regeln (Landwirthschaftl. Versuchs-Stationen, Bd. XXXIII S. 395) vorzunehmen; die Extraction des Fettes geschieht hierbei sowohl schneller wie vollständiger, besonders in magerer Milch.

2) Meddelelser fra Carlsberg Laboriet, II. Bd., S. 1. — Zeitschrift für analytische Chemie.

Das Filtrat nahm beim Eindunsten eine blaugrüne Farbe von Kupfersalz an, zeigte sich aber ganz stickstofffrei.

Von anderen Metallsalzen hat Storch¹⁾ basisches Bleiacetat zur Fällung der Eiweisskörper der Milch angewendet, doch so, dass die Hauptmasse der Eiweisskörper erst mit Alkohol gefällt wurde. Dasselbe Fällungsmittel ist auch neuerlich von E. Gottlieb²⁾ zur Bestimmung der Eiweisskörper in Rüben benutzt worden. Die Vollständigkeit der Ausfällungen, die mit diesem Reagense zu erhalten sind, ist doch sehr gering, wovon ich mich mehrere mal mit Eiweisslösungen verschiedener Art überzeugt habe. Es lässt sich rein qualitativ nachweisen, dass während ein Tropfen des Fällungsmittels einen grossen voluminösen Niederschlag erzeugen kann, so kann dieser wieder durch einen Ueberschuss von 1—2 Tropfen vollständig oder fast zum Verschwinden gebracht werden. In den unten zu besprechenden quantitativen Versuchen, wo das Filtrat durch Prüfung mit einem Tropfen Bleiessig keine weitere Fällung hervorbrachte, und es also nicht an Fällungsmittel fehlte, verblieb ca. die Hälfte bis zum dritten Theil der ganzen Stickstoffmenge ungefällt. In der Weise verwendet, wie Storch es bei seiner Methode thut, wo nur kleine Mengen zu bestimmen sind, wird doch dieser Fehler, auf der ganzen Milchmenge berechnet, kaum eine praktische Bedeutung bekommen, welches sich auch dadurch zeigt, dass die Stickstoffmenge der Milch, welche nach Ausfällung der gesammten Eiweisssubstanz übrig bleibt, keiner besonders in die Augen fallenden Variation unterworfen ist, ob man diese Ausfällung nach Storch's Vorschrift oder nach anderen Methoden vornimmt.

Von grösserer Bedeutung wird der Fehler werden, welcher entsteht, wenn man die ganze Differenz zwischen dem Gewichte des Bleiniederschlages und dessen Glühungsrückstand als Eiweisssubstanz berechnet. Nach der Natur des betreffenden Fällungsmittels lässt es sich nämlich erwarten,

1) Storch, Mikroskopiske og kemiske Undersøgelser over Smørdannelsen ved Kärning. Kjöbenhavn 1883.

2) Thomsens Tidsskrift for Fysik og Kemi (dänisch). 1887. S. 225.

dass der Bleiniederschlag ausser Eiweisssubstanz und feuerfeste Bestandtheile auch noch etwas Essigsäure, Wasser und Kohlensäure in variabler Menge enthalten wird, und diese Bestandtheile werden alsdann als Eiweisssubstanz mitgerechnet.

3. Lösung von reinem Kasein.

9,860 gr. Lösung hinterliess beim Eintrocknen bei 110° C. 0,094 gr. aschenfreies Kasein, woraus sich 0,154% N in der Lösung berechnen lässt.

5,137 gr. Lösung gab 5,6 ccm. $\frac{1}{10}$ norm. N = 0,00784 gr., α : 0,152% N.

9,864 gr. Lösung wurde mit 8 Tropfen Bleiessig gefällt; hierdurch entstand

0,129 gr. Fällung,
worin 0,051 gr. Asche,

also 0,078 gr. verglühbare Substanz,

α : 0,791%. Wird dies alles als Eiweisssubstanz berechnet, erhält man 0,124% N.

Das Filtrat ergab nach Eindampfen 5,2 ccm. $\frac{1}{10}$ norm. N = 0,00728 gr.,

α : 0,07% N.

Die Summe ist also 0,194% N oder 0,04% zu hoch.

4. Lösung von reinem Ovalbumin.

10,00 gr. Lösung enthielt 18,0 ccm. $\frac{1}{10}$ norm. N = 0,0252 gr., α : 0,252%.

10,00 gr. Lösung wurden mit 7 Tropfen Bleiessig gefällt, wodurch entstanden

0,178 gr. Fällung,
hierin 0,051 gr. Asche,

also 0,127 gr. verbrennbare Substanz,

welche, als Eiweisssubstanz berechnet, 0,199% entspricht.

Das Filtrat enthielt 6,3 ccm. $\frac{1}{10}$ norm. N = 0,00882 gr., α : 0,082% N.

Die Summe ist hier 0,287% N oder 0,035% zu hoch.

Die folgenden beiden Präparate sind durch Fällen mit Bleiessig dargestellt, und zwar theils aus Milch (5), theils aus dem Filtrate von Milch, welche nach Storch mit dem gleichgrossen Volum Alkohol von 92° Tr. gefällt ist, darauf zum Entfernen des Alkohols auf dem Wasserbade eingedunstet, und wiederum von etwas coagulirtem Albumin abfiltrirt (6). Die Bleifällungen sind nach vollständigem Auswaschen, Trocknen und Extraction mit Aether, um das Fett zu entfernen, auf den Stickstoffgehalt untersucht worden. Es zeigte sich hierbei im Stickstoffgehalte auf der aschenfreien Substanz berech-

net eine bedeutende Variation, und zwar war derselbe in beiden Fällen bedeutend niedriger als in den reinen Eiweisskörpern der Milch.

5. 0,4065 gr. Substanz enthielt 0,151 gr., ρ : 37,16% Asche.
0,1075 gr. Substanz gab 13,1 cbcm. $\frac{1}{20}$ norm. N = 0,00917 gr.;
d. i. in verbrennbarer Substanz 13,59% N.
- 0,127 gr. Substanz gab 15,5 cbcm. $\frac{1}{20}$ norm. N = 0,01085 gr.;
d. h. in verbrennbarer Substanz 13,56% N.
6. 0,8815 gr. Substanz enthielt 0,5935 gr., ρ : 67,33% Asche.
0,240 gr. Substanz gab 10,6 cbcm. $\frac{1}{20}$ norm. N = 0,0742 gr.; d. h.
in verbrennbarer Substanz 9,45% N.
- 0,230 gr. Substanz gab 10,0 cbcm. $\frac{1}{20}$ norm. N = 0,0700 gr.; d. h.
in verbrennbarer Substanz 9,32% N.

Als weit vollständigere Fällungsmittel sind Gerbsäure- und Phosphorwolframsäurelösungen zu betrachten.

Almén¹⁾ brachte zuerst die Anwendung von Gerbsäure für quantitative Eiweissbestimmungen in Vorschlag. Darauf machte Liborius²⁾ einige Versuche, um Eiweisskörper mit einer Gerbsäurelösung zu titiren, und es schien aus seinen Untersuchungen hervorzugehen, dass die beiden Körper sich mit einander nach ziemlich constanten Verhältnissen verbinden, so dass die Eiweissmenge ungefähr 60% der Verbindung ausmacht. Seine Bestrebungen, gewichtsanalytische Bestimmungen auf diesem Wege zu machen, scheiterten daran, dass die Verbindung beim Auswaschen mit Weingeist zerstört wurde.

Die Gerbsäuremethode wurde nun näher von Girgensohn³⁾ und von Taraszewicz⁴⁾ untersucht, wonach die Titirmethode als weniger sicher verlassen wurde, während es zu gleicher Zeit angegeben wurde, dass wenn man die Milch mit Gerbsäure nach näher beschriebenen Regeln fällt, und darauf den getrockneten Niederschlag erst mit reinem Petroleumäther, dann mit kochendem Weingeist von ca. 90° Tr.

1) Upsala läkareförenings förhandlingar, 1870.

2) Liborius, Beitrag zu quantit. Eiweissbestimmungen. Dorpat 1871.

3) Beiträge zur Albuminometrie u. z. Kenntniss der Tanninverbindungen der Albuminate. Dorpat 1872.

4) Einige Methoden zur Werthbestimmung der Milch. Dorpat 1873.

extrahirt, bleibt die ganze Eiweissmenge in reinem Zustande zurück.

Um den Grad der Vollständigkeit zu untersuchen, womit die Eiweisskörper sich mittelst Gerbsäure ausfällen lassen, werden die folgenden Versuche vorgenommen, und zwar mit Lösungen von 1. reinem Ovalbumin, aus Hühnereieiweiss dargestellt, so wie S. 137 besprochen; — 2. und 3. aus reinem Kasein und Calciumphosphat; — 4. aus reinem Kasein in möglichst wenig Alkali gelöst; — 5. aus reinem Laktalbumin; — 6. aus Ovalbumin, welches zwar etwas Magnesiumsulfat enthielt, aber frei von fremden stickstoffhaltigen Bestandtheilen war. In 1, 4 und 5 wurden vor der Fällung einige cbcm. gesättigte Kochsalzlösung der Flüssigkeit zugesetzt. Die Gerbsäurelösung war nach Almén's Recept¹⁾ bereitet und in folgenden Mengen verwendet: bei 1: 5 cbcm.; bei 2: 10 cbcm.; bei 3: 10 cbcm.; bei 4: 2 cbcm.; bei 5 und 6 nicht näher bestimmte Mengen. In sämtlichen Versuchen wurde eine directe Bestimmung der totalen Stickstoffmenge der Lösung vorgenommen. In der mit Gerbsäure gefällten Portion wurde der Niederschlag vollständig mit kaltem Wasser ausgewaschen und dann die Stickstoffbestimmung theils in dem Niederschlage, theils in dem eingedunsteten Filtrate vorgenommen.

| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. |
|--|--------|---------|--------|--------|---------|--------|
| ‰ Total-Stickstoff, direct bestimmt. . . | 0,294 | 0,152 | 0,294 | 0,221 | 0,229 | 1,18 |
| gr. Lösung zur Fällung benutzt | 10,0 | 9,930 | 10,000 | 10,000 | 11,550 | 5,541 |
| gr. N im Niederschlage | 0,0294 | 0,01512 | 0,0288 | 0,0224 | 0,02506 | 0,0652 |
| ‰ N im Niederschlage | 0,294 | 0,152 | 0,288 | 0,224 | 0,217 | 1,177 |
| gr. N im Filtrate . . . | 0,0007 | 0,00098 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| ‰ N im Filtrate . . . | 0,007 | 0,01 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Es geht hieraus hervor, dass die Gerbsäure im Stande ist, jede Spur von Eiweisssubstanz auszufällen, wenigstens

¹⁾ L. c.: 4 gr. Gerbsäure, 8 cbcm. 25 procentige Essigsäure, 190 cbcm Weingeist (ca. 40—50procentig).

jedenfalls bei den drei untersuchten Eiweissmodificationen. Doch ist zu bemerken, dass es für das Gelingen der Fällung nothwendig ist, dass sich eine hinreichende Salzmenge in die Lösung findet; eine fast aschenfreie Eiweisslösung wird ebenso schwer mit Gerbsäure wie bei anderen Coagulationsmethoden (Weingeist, Kochhitze) gefällt. Ist die Lösung sehr verdünnt, setzt man also am besten etwas Kochsalz, Natriumacetat, Magnesiumsulfat oder dergleichen hinzu.

Die Versuche, welche in obiger Tabelle dargestellt sind, scheinen anzudeuten, dass ein Ueberschuss an Gerbsäure nicht schädlich auf die Vollständigkeit der Fällung influirt¹⁾. Noch deutlicher geht dies doch aus den folgenden Versuchen hervor:

Von einer mittelst etwas Natriumphosphat bereiteten Kaseinlösung wurde gefällt:

- a) 5,358 gr. Lösung mit ca. 5 cbcm. Gerbsäurelösung. Der voluminöse Niederschlag enthielt nach dem Auswaschen 0,01372 gr. = 0,256% N. Das Filtrat war ganz stickstofffrei.
- b) 5,363 gr. Lösung mit 50 cbcm. Gerbsäurelösung. Der Niederschlag zog sich hierbei zu harzartigen Klümpchen zusammen; er enthielt 0,01358 gr. = 0,253% N. Auch hier war das Filtrat ganz stickstofffrei.

Uebrigens ist aber die Behandlung des Niederschlages durchaus nicht gleichgültig. Die Fällung soll in der Kälte geschehen und das Waschen mit kaltem Wasser vorgenommen werden. Wäscht man mit kochendem Wasser oder mit Weingeist, wird ein messbarer Theil des ausgefällten Eiweisskörpers wieder in Lösung gehen, so wie es aus den jetzt zu beschreibenden Versuchen dargelegt wird.

Die Reihe 1 wurde mit einer reinen Ovalbuminlösung, in vorher beschriebener Weise gewonnen, dargestellt;

2: mit Lösungen von reinem Kasein;

3: mit gewöhnlichem Hühnereiweiss, welches nur mit Wasser verdünnt, und von den ausgeschiedenen Membranen

1) Bei einem unverhältnissmässig grossen Ueberschuss an Fällungsmittel wird doch möglicherweise die bedeutende Weingeistmenge, die hierdurch in die Mischung gebracht wird, hindernd wirken (siehe unten).

und Globulinsubstanzen abfiltrirt, darauf mit etwas Kochsalzlösung versetzt wurde;

4: mit gewöhnlicher Magermilch, mit ihrem doppelten Volumen Wasser verdünnt, und ausserdem mit etwas Kochsalzlösung versetzt.

Von jeder von diesen Lösungen wurden mehrere gleich grosse Portionen à 10 ccm. genau abgemessen, und darauf mit gleich grossem Ueberschusse von Gerbsäurelösung gefällt. Der Niederschlag wurde in folgender Weise behandelt:

- a) Der Niederschlag wurde mit kaltem Wasser gewaschen und dann getrocknet.
- b) Die Mischung wurde nach der Fällung gewärmt, wobei der Niederschlag sich zu harten, spröden Klümpchen zusammenballte; die letzteren wurden auf dem Filtrum gesammelt und wie in a mit kaltem Wasser gewaschen.
- c) Der nicht erwärmte Niederschlag wurde mittelst kaltem Wasser auf das Filter gebracht, zuerst einige mal mit kaltem Wasser, darauf mit kochendem Wasser gewaschen, wobei er sich stark zusammenballte.
- d) Der nach a mit kaltem Wasser gewaschene Niederschlag wurde weiter mit kaltem Weingeist von 97° Tr. behandelt.
- e) Der Niederschlag wurde wie in d, jedoch mit kochendem Weingeist behandelt.

Meistens wurde das Filtrat trübe schon beim Auswaschen mit kochendem Wasser oder mit Weingeist, und während dem Einkochen des Filtrates schieden sich grosse Flocken aus, die sich bei der Stickstoffbestimmung als Eiweisssubstanz zeigten.

Weil die Lösungen 3 und 4 nicht reine Eiweisslösungen waren, liess es sich erwarten, dass die Niederschläge etwas Fett enthalten konnten, weshalb dieselben nach dem Auswaschen mit Wasser, resp. Weingeist, und nachherigem Trocknen, mit Petroleumäther behandelt wurden, um sie zu entfetten; darauf wurde wieder bis zum constanten Gewicht getrocknet.

| Versuch. | Gewicht der Fällung mgr. | mgr. N in der Fällung. | mgr. N im Filtrat. | Total-N mgr. | Procent des Total-N's in der Fällung. | Procent des Total-N's im Filtrat. | Procent N in der Fällung. |
|----------|--------------------------|------------------------|--------------------|--------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 1. a) | 53,2 | 4,97 | 0,07 | 5,04 | 98,61 | 1,4 | 9,34 |
| c) | 35,0 | 4,76 | 0,07 | 4,83 | 96,07 | 1,4 | 13,60 |
| d) | 27,8 | 4,41 | 0,56 | 4,97 | 88,7 | 11,2 | 15,87 |
| 2. a) | 289 | 34,30 | 0,49 | 34,80 | 98,5 | 1,5 | 11,37 |
| b) | 287 | 32,83 | 2,00 | 34,83 | 94,2 | 5,8 | 11,44 |
| e) | 288 | 32,55 | 2,05 | 34,60 | 94,1 | 5,9 | 11,30 |
| 3. a) | 129,4 | 11,97 | 1,12 | 13,09 | 91,5 | 8,5 | 9,25 |
| b) | 86,9 | 11,13 | 2,10 | 13,23 | 84,1 | 15,9 | 13,80 |
| d) | 68,1 | 10,78 | 2,31 | 13,09 | 82,4 | 17,6 | 15,9 |
| e) | 65,3 | 10,78 | 2,31 | 13,09 | 82,4 | 17,6 | 16,5 |
| 4. a) | 169,5 | 15,26 | 1,68 | 16,94 | 90,1 | 9,9 | 9,36 |
| b) | 144,5 | 14,91 | 1,82 | 16,73 | 89,1 | 10,9 | 10,32 |
| c) | 133,5 | 14,21 | 2,66 | 16,87 | 84,3 | 15,7 | 10,62 |
| d) | 98,5 | 14,00 | 3,08 | 17,08 | 82,0 | 18,4 | 14,2 |

Die minimalen Stickstoffmengen, die sich in den Filtraten 1a und 2a finden, können als bedeutungslos betrachtet werden, und in diesen Fällen darf man sagen, dass die Gerbsäure eine vollständige Ausfällung der reinen Eiweisskörper bewirkt hat. Die bedeutend weniger vollständige Ausfällung des Stickstoffes in 3a und 4a beruht darauf, dass sowohl Milch wie Hühnereiweiss etwas nicht eiweissartige, aber doch stickstoffhaltige Substanz enthält. Bemerkenswerth ist, dass die ca. 9% der totalen Stickstoffmenge der Milch, welche nicht mit Gerbsäure auszufällen ist, mit dem Resultate zahlreicher anderen Analysen, nach anderen Methoden angestellt, übereinstimmen.

In den Versuchsserien 1, 3 und 4 ist bei dem Auswaschen mit kochendem Wasser und mit Weingeist relativ mehr Gerbsäure als Eiweisssubstanz entfernt worden, so dass annäherungsweise reine Eiweisssubstanz hinterlassen ist. Es liess sich daher denken, dass man am einfachsten den mit Wasser ganz ausgewaschenen Niederschlag erst vollständig trocknet, um die

Eiweisssubstanz unlöslich zu machen, ehe man die Extraction mit Weingeist beginnt. Hierdurch sollte sich danach die Fällung als reine Eiweisssubstanz ohne Verlust wägen lassen. Doch wird man erfahren, dass die Fällung sich beim Trocknen zu einer lederartigen Masse zusammenzieht, welche mit dem Filtrum zusammenklebt und ganz unzugänglich für die Einwirkung des Weingeistes wird.

Die Zusammensetzung des mit kaltem Wasser ausgewaschenen und darauf getrockneten Gerbsäureniederschlages wird erhellt theils aus obigen Beispielen, theils aus den nachfolgenden Stickstoffbestimmungen in derartigen Fällungen verschiedener Darstellung:

| | | | | |
|-----|--------------------|---------|----------------|-----------|
| 1. | 0,010 gr. Substanz | enthält | 0,00161 gr. N, | o: 16,1% |
| 2. | 0,0115 » | » | 0,00112 » | o: 9,8 » |
| 3. | 0,011 » | » | 0,00112 » | o: 10,2 » |
| 4. | 0,0345 » | » | 0,00364 » | o: 10,5 » |
| 5. | 0,035 » | » | 0,00378 » | o: 10,8 » |
| 6. | 0,0395 » | » | 0,00395 » | o: 10,0 » |
| 7. | 0,047 » | » | 0,00462 » | o: 9,8 » |
| 8. | 0,095 » | » | 0,00917 » | o: 9,9 » |
| 9. | 0,1135 » | » | 0,00910 » | o: 8,0 » |
| 10. | 0,1135 » | » | 0,00790 » | o: 7,0 » |

Sieht man von den beiden extremen Fällen mit 16 und 7% ab, so bewegt sich die Variation des Stickstoffgehaltes wesentlich zwischen 8 und 11,37%, welches einem Gehalt von 51 bis 75% Eiweisssubstanz (mit 15,7% N) entspricht. Was das erstere Extrem mit 16% Stickstoff betrifft, so mag dieses möglicherweise in einem directen Fehler in der Bestimmung begründet sein, denn eine Aufnahme von nur 0,5 mgr. fremden Stickstoff aus der übrigens stets relativ ammoniakfreien Laboratoriumsatmosphäre würde eine solche Abweichung vom Normalen bewirken können; dagegen wird die Ursache zur Abweichung im letzteren Falle (mit 7%) vielleicht eher in einem weniger vollständigen Auswaschen des ziemlich grossen und voluminösen Niederschlages zu suchen sein. Selbst wenn man aber einräumen will, dass die Variation des Stickstoffgehaltes nur selten über 10% steigt (64% Eiweisssubstanz entsprechend) oder unter 9% sinkt (57% Eiweisssubstanz

entsprechend), so wird doch diese Variation so bedeutend sein, dass der Fehler, womit das Gewicht einer Fällung von sämtlichen Eiweisskörpern der Milch behaftet wird, einen bedeutenden Procenttheil der ganzen Milchmenge ausmachen kann.

Anders stellt es sich dagegen, wenn die Methode als «Restmethode» angewendet wird, nachdem man zuerst die Hauptmenge der Eiweisskörper mit anderen Mitteln, z. B. mit Weingeist, oder Erhitzen, oder mit Säure entfernt hat. In solchem Falle wird der ganze Gerbsäureniederschlag von dem im Filtrate bleibenden Reste höchstens einige Centigramm pr. 10 gr. Milch betragen, und dann wird der Fehler, welcher entsteht, wenn man mit Liborius 60% des Niederschlages anstatt 57 oder 64%, keine besonders grosse Bedeutung erhalten; denn selbst wenn man 0,100 gr. Gerbsäureniederschlag annimmt, so wird der Fehler, wenn man 60% hiervon als Eiweisssubstanz rechnet, höchstens 0,010 gr. ausmachen, oder auf 10 gr. Milch umgerechnet, 0,1%.

Während also die Gerbsäure eine absolut vollständige Ausfällung der eigentlichen Eiweisskörper bewirkt, werden die peptonartigen Körper, sowohl wirkliche «Peptone» wie «Albumosen», höchst unvollständig von diesem Reagense gefällt. In den folgenden Versuchen mit Lösungen, die Digestionsproducte verschiedener Eiweisskörper mit Pepsin und Salzsäure enthielten, war die Fällung stets mehr oder weniger unvollständig.

1. Ein Präparat aus Deuteroalbumin (Kühne) bestehend [Meissner's b-Pepton] wurde durch Pepsindigestion einer Lösung von reinem Kasein in Salzsäure von $\frac{1}{4}\%$ HCl, Abfiltriren des ausgeschiedenen Nucleins, Sättigung des neutralisirten und eingedunsteten Filtrats mit Kochsalz in Substanz und Fällung des Filtrates von den ausgeschiedenen Prot-, Hetero- und Dysalbumosen mit Essigsäure gewonnen. Die ausgeschiedene Deuteroalbumose wurde nach Neutralisation und Lösung in Wasser durch weitere Sättigung mit Kochsalz u. s. w. gereinigt, und endlich wurde der grösste Theil des Kochsalzes aus der neutralisirten Lösung des zwei mal mit

Essigsäure gefällten Niederschlages durch Dialyse entfernt. Es zeigte sich alsdann keine Fällung mehr mit Kochsalz in Substanz, auch nicht mit mittelstarker Salpetersäure, wohl aber mit einer essigsäuren Lösung von gelbem Blutlaugensalz.

Eine solche Lösung enthielt:

in 4,103 gr. 0,00574 gr. N = 0,140‰.

9,985 gr. Lösung wurden mit etwas Salzlösung und Ueberschuss an Gerbsäure gefällt. Der Niederschlag enthielt 0,0042 gr. N = 0,04‰.

2. Ein Deuteroalbumosepräparat, in analoger Weise aus Fibrin dargestellt, zeigte dieselben Reactionen wie das obige.

5,063 gr. Lösung enthielten im Ganzen 0,03612 gr. N, α : 0,713‰.

5,215 gr. derselben Lösung wurden mit etwas Salz und Ueberschuss von Gerbsäure gefällt. Der Niederschlag enthielt 0,0231 gr. N, α : 0,443‰. Das Filtrat enthielt 0,01512 gr. N, α : 0,290‰.

3. Ein Präparat, hauptsächlich aus Protalbumose bestehend, wurde dargestellt aus coagulirtem Hühnereiweiß, Fällung des neutralisirten und filtrirten Digestionsproductes mit Kochsalz und Reinigung der hierbei entstehenden Fällung durch wiederholtes Lösen, Filtriren, Fällern und endlich Dialyse.

9,885 gr. der Lösung wurden mit etwas Salzlösung und Ueberschuss an Gerbsäure gefällt. Der Niederschlag enthielt 0,00434 gr. N, α : 0,044‰.

Das Filtrat enthielt 0,00364 gr. N, α : 0,037‰.

4. Eine andere Lösung desselben Präparates wurde in derselben Weise behandelt.

4,966 gr. Lösung gaben in der Fällung mit Gerbsäure 0,00392 gr. N, α : 0,079‰. Das Filtrat enthielt 0,00252 gr. N, α : 0,051‰.

5. Ein ähnliches Präparat anderer Darstellung.

6,760 gr. Lösung enthielten 0,00518 gr. N, α : 0,077‰.

9,964 gr. Lösung wurden mit Salz und Gerbsäure gefällt. Die Fällung enthielt 0,00392 gr. N, α : 0,039‰. Das Filtrat enthielt 0,00406 gr. N, α : 0,041‰.

6. Reines Pepton wird von Ueberschuss an Gerbsäure vollständig gelöst. Die Digestionsproducte von reinem Kasein wurden nach dem Abfiltriren des Nucleins mit pulverförmigem Ammoniumsulfat gesättigt, wodurch sämtliche Albumosen ausgeschieden werden. Das Filtrat hiervon wurde, nach Verdünnen, mit einer nicht hinreichenden Menge Gerbsäure

gefällt. Der näheren Untersuchung halber wurde der ausgeschiedene Niederschlag abfiltrirt, ausgewaschen und in Wasser aufgeschlämmt, darauf mit geringem Ueberschuss von Barytwasser zersetzt, wonach der Ueberschuss von letzterem wieder durch einen Kohlensäurestrom entfernt wurde. Die so erhaltene Lösung zeigte, nach Concentration bei ca. 40° C., starke Biuretreaction mit Kupfersulfat und Natron, dagegen keinen Niederschlag, weder beim Kochen allein, noch beim Sättigen mit Kochsalz, noch Zusatz von Salpetersäure, auch nicht mit Kochsalz und Essigsäure zusammen, noch mit Blutlaugensalz und Essigsäure. Die Lösung enthielt somit echtes Pepton (im Kühne'schen Sinne; Meissner's c-Pepton). Ammoniumsulfat brachte zwar eine Trübung hervor, die doch aber wahrscheinlich durch Reaction des Sulfats auf das stark barythaltige Präparat herrührte. Gerbsäurelösung rief eine starke flockige Fällung hervor, die sich beim Ueberschusse des Fällungsmittels stark zusammenballte und zuletzt vollständig wieder in Lösung ging.

Die eiweissfällenden Eigenschaften der Phosphorwolframsäure sind wenigstens ebenso gross wie die der Gerbsäure. Dies Reagens wurde bei meinen Versuchen als eine Lösung der krystallisirten Säure in 5 Theile Wasser, welche mit 2% concentrirte Schwefelsäure vermischt wurde, verwendet.

1. 10,865 gr. einer Ovalbuminlösung wurden mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag enthielt 0,00854 gr. N, \approx 0,079%; das Filtrat war dagegen ganz stickstofffrei.
2. 10,040 gr. einer Lösung von reinem Kasein gaben in der Fällung mit Phosphorwolframsäure 0,0182 gr. N, \approx 0,181%; das Filtrat war auch hier ganz stickstofffrei.

Den Albumosen gegenüber verhält die Phosphorwolframsäure sich, wenn auch nicht ganz unzweideutig als ein absolut vollständiges Fällungsmittel, so doch als ein mehr vollständiges solches als die Gerbsäure.

1. Die S. 149, 3 genannte Lösung von Protalbumose aus Ovalbumin, welche im Ganzen 0,081% N enthielt, wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag aus 9,877 gr. Lösung enthielt 0,00756 gr. N, \approx 0,077% in der Lösung. Das Filtrat enthielt 0,0014 gr. N, \approx 0,014%.

2. 4,968 gr. einer anderen Lösung derselben Substanz (S. 149, 4) zeigte im Phosphorwolframsäureniederschlag 0,00616 gr. N, α : 0,124%, während die totale Stickstoffmenge oben (S. 149) zu 0,130% bestimmt wurde.
3. Eine grössere Menge (ca. 1,5 gr.) eines Albumosepräparats, sowohl Protalbumose wie Deuteroalbumose enthaltend, wurde in Wasser gelöst, und so lange mit Schwefelsäure- und Phosphorwolframsäurelösung gefällt, bis weiterer Zusatz keine Fällung mehr gab. Das gesammelte Filtrat wurde eingeeengt und wie eine Stickstoffbestimmung behandelt, zeigte sich aber ganz stickstofffrei.

Das Verhalten zu Pepton wurde bei dem folgenden Versuche mit dem oben beschriebenen Präparate von reinem Kaseinpeptone geprüft:

Der Phosphorwolframsäureniederschlag aus 12,398 gr. Lösung enthielt 0,02285 gr. N, d. h. 0,184% vom Gewichte der Lösung. Das Filtrat hiervon, welches bei der Prüfung mit mehr Fällungsmittel keine vermehrte Fällung gab, enthielt noch 0,00126 gr. N, α : 0,01%.

Das Resultat stimmt wohl am nächsten mit dem von Hirschler¹⁾ gefundenen überein, wonach die Peptone von Phosphorwolframsäurelösungen vollständig gefällt werden.

2. Finden sich in der Milch ausser den eigentlichen Eiweisskörpern auch Albumosen und Peptone, die möglicherweise auf eine Bestimmung der Totaleiweissmenge influiren können?

Die Frage von dem Vorkommen von Pepton in der Milch ist zu verschiedenen Zeiten in der physiologisch-chemischen Literatur sehr verschieden beantwortet worden²⁾. Am meisten sind die Peptone und Albumosen unter eins betrachtet worden. Wird man sich indessen von dem Vorhandensein des wirklichen Peptons (im Kühne'schen Sinne) überzeugen, so muss man erst mit Ammoniumsulfat alle sowohl eigentlichen Eiweisskörper wie Albumosen entfernen. Da nun aber die Peptone mit Sicherheit nicht viele andere positive Reactionen als die Biuretreaction und die Gerbsäurereaction zeigen, in-

1) Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XI, S. 27-29.

2) Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. II, S. 288. — Schmidt-Mülheim, Archiv f. die gesammte Physiologie, Bd. XXVIII, S. 287. — Dogiel, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IX, S. 591.

dem die Reaction mit Phosphorwolframsäure nicht bei Gegenwart von Ammoniumsulfat anzuwenden ist, werden die beiden genannten Reactionen auf das Filtrat der mit Ammoniumsulfat gesättigten Flüssigkeit von dem Vorhandensein des Peptons Aufklärung geben können.

Die Untersuchungen wurden in folgender Weise ausgeführt. Eine passende Menge, ca. 50 ccm. der auf Pepton zu untersuchenden Milch, wurde bei nicht gar zu niedriger Temperatur (ca. 20° C.) vollständig mit festem, fein gepulvertem Ammoniumsulfat gesättigt. Nach völliger Sättigung wurde die Mischung filtrirt und, der Controlle halber, das Filtrat stets mit etwas mehr Ammoniumsulfat geprüft.

Um nun die Biuretreaction auf diesem Filtrate anzustellen, wurde es nach Kühne's Vorschrift¹⁾ mit einem grossen Ueberschusse, ca. 2 $\frac{1}{2}$ Volumen ca. 40procentiger Natronlauge versetzt, und danach eine verdünnte Lösung von Kupfersulfat zugetröpfelt, bis eine beginnende Farbennuance eben zu sehen ist. Geht diese in Richtung von reinem Blau, so ist sie nur auf die Einwirkung des überschüssigen Ammoniaks auf das Kupfersalz begründet, hat sie dagegen einen röthlich violetten Ton, so beruht dies auf anwesendem Pepton.

Diese Reaction ist doch keineswegs fein. Ein Controllversuch mit einer gesättigten wässerigen Lösung von Ammoniumsulfat, welche mit ca. 0,005% Pepton in wässrige Lösung versetzt war, und die mit Gerbsäure einen deutlichen, im Ueberschuss vom Fällungsmittel löslichen Niederschlag gab, zeigte bei Anstellung der Biuretprobe nur eine reine blaue Farbe. Setzte man dagegen so viel Pepton hinzu (ca. 0,1%), wie Schmidt-Mülheim als normaler Bestandtheil der Milch angiebt, so erhält man eine sehr starke und deutliche rothviolette Biuretreaction. Bei Untersuchungen von Milch und dergleichen Substanzen ist die Reaction stets einigermaßen schnell auszuführen und zu beurtheilen; wartet man eine Stunde lang, wird nämlich immer eine Rothfärbung von ausgeschiedenem Kupferoxydul, von der Reaction des Milch-

¹⁾ Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. IV, S. 424.

zuckers auf die stark alkalische Kupferlösung herrührend, auftreten.

Die Prüfung mit Gerbsäure wird so ausgeführt, dass man das mit seinem gleichen Volum Wasser verdünnte salzgesättigte Filtrat mit einigen Tropfen Gerbsäurelösung versetzt. Vorhandensein von Pepton wird dann eine Fällung hervorrufen, welche jedoch bei Ueberschuss von Gerbsäure wieder verschwinden wird.

Bei in beschriebener Weise angestellten, mehrere mal wiederholten Prüfungen der Milch zu verschiedenen Zeiten des Jahres, sowohl als Vollmilch als in abgerahmtem Zustande, sowohl von einer ganzen Heerde wie von einzelnen Kühen, im letzteren Falle sowohl vom Beginne wie vom Schluss der Laktationsperiode, konnte ich indessen nie eine Spur von einem positiven Ausschlag der Reaction, weder bei der Biuretprobe noch mit Gerbsäure, entdecken. Auch das Suchen nach Pepton in Colostrum blieb ohne positives Resultat. Auch nicht in Milch, welche nach 10tägigem Stehen bei ca. 10° C. stark sauer geworden war, konnte ich, im Gegensatz zu Hofmeister¹⁾, Pepton nachweisen. Dasselbe gilt auch von saurer Buttermilch.

Da sich bei der Labwirkung auf Kasein ein leicht lösliches «Molkenprotein» bildet, welches nach Ausscheidung des Käses in den Molken zurückbleibt, und dieser Körper nach den Untersuchungen von Hammarsten²⁾ und Köster³⁾ eine mit den Peptonen jedenfalls nahe verwandte Substanz zu sein scheint, war es denkbar, dass eine in oben besprochener Weise vorgenommene Untersuchung der Molken positive Reaction auf Pepton zeigen würde. Das Resultat blieb jedoch stets negativ; ein einziger Fall ausgenommen, wo zwar die Biuretreaction auch ausblieb, aber Gerbsäure einen äusserst schwachen Niederschlag hervorrief, der jedoch erst nach mehreren Stunden Stehenlassen deutlich wurde.

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. II.

2) Upsala läkareförenings förhandlingar, 1874, Bd. IX.

3) Ib., 1881, Bd. XVI.

Bei häufiger Wiederholung des Versuches mit anderen Molkenproben blieb die Reaction immer aus:

Es scheint somit, als ob selbst solche fermentative Prozesse, die bei der Säuerung und der Käsung der Milch wirksam sind, keine Peptonbildung hervorzurufen im Stande sind. Trotzdem lässt es sich aber wohl denken, dass andere Producte, aus Milch durch fermentative Wirkungen dargestellt, Peptone enthalten können. Von solchen hat Hammarsten¹⁾ den Kefir untersucht, doch auch mit dem Resultate, dass eigentliches Pepton (im Kühne'schen Sinne) hierin nicht vorkömmt.

Dagegen darf in diesem Zusammenhange die sogenannte «fadenziehende Milch» (schwedisch: «lång- oder tätmjölk»), welche in den nördlichen Gegenden von Skandinavien und in Finland als ein beliebtes Nahrungsmittel consumirt wird, besprochen werden. Mit einer solchen, als «långmjölk» signirten, aus Jemtland in Schweden erhaltenen Probe wurde im Sommer 1886 gewöhnliche süsse, neugemolkene Milch inficirt. Die Mischung stand ca. 1 Jahr bei gewöhnlicher Stubentemperatur in einer lose verschlossenen Flasche; sie zeigte danach zwar keine völlig so ausgesprochene zähe, schleimige Consistenz, als die Beschreibungen von diesem Producte ihr beilegen, aber wurde doch von einem eingeborenen «Norrländer» für echte «långmjölk» erklärt. Es hatte sich keine Spur von Schimmelvegetation eingefunden; die Reaction war stark sauer. Nach vollständigem Sättigen mit Ammoniumsulfat zeigte das Filtrat gleich eine starke Biuretreaction, und mit Gerbsäure wurde in dem mit Wasser verdünnten Filtrate eine im Ueberschuss vom Fällungsmittel grosse Fällung erhalten.

Die gleiche Untersuchung mit einer neuen Probe von «långmjölk», die direct aus der Umgebung von Umeå im nördlichen Schweden versendet war, zeigte dieselben starken Reactionen, sowohl bei der Biuretprobe wie mit Gerb-

¹⁾ Upsala läkareförenings förhandlingar, 1886; — auch Eigenreferat in Maly's Jahresbericht, Bd. XVI, S. 163.

säure, auf einen nicht unbedeutenden Enthalt von Pepton deutend.

Der Umstand, dass in den Molken kein eigentliches Pepton sich nachweisen liess, liess vermuthen, dass das Molkenprotein vielleicht eher zu der Gruppe der mit Ammoniumsulfat fällbaren Albumosen gehöre, welche übrigens in mehreren Hinsichten mit dem Pepton Aehnlichkeit zeigen. Da die Albumosen, im Gegensatz zu den eigentlichen Eiweisskörpern, nur unvollständig von überschüssiger Gerbsäure gefällt werden (siehe oben S. 148—149), wäre es möglich, dass man, unter Voraussetzung von der Richtigkeit der oben besprochenen Annahme, beim Versetzen der Molken mit einem Ueberschuss von Gerbsäurelösung eine grössere Stickstoffmenge im Filtrate erhalten wird, als wenn man nur eben die zur Ausscheidung der eigentlichen Eiweisskörper nöthige Gerbsäuremenge hinzusetzt. Ein negatives Resultat dürfte doch nicht als Gegenbeweis gegen die Albumosenatur des Molkenproteins aufgefasst werden, da diese Substanz jedenfalls nur in sehr geringer Menge in den Molken vorhanden ist, und es ist zu erwarten, dass die betreffenden Differenzen in den analytischen Ergebnissen, worauf die obige Annahme gestützt werden sollte, nur höchstens minimal sind.

1. 5,103 gr. Molken enthielten im Ganzen 0,0756 gr. N, α : 0,148%.

2. 5,080 gr. Molken wurden mit 2,5 ccm. Gerbsäurelösung gefällt:

Der Niederschlag enthielt . . . 0,0056 gr. N, α : 0,110%.

das Filtrat 0,00168 » » α : 0,033

Summa 0,143%.

3. 5,087 gr. Molken wurden mit 10 ccm. Gerbsäurelösung gefällt:

Im Niederschlage war 0,0053 gr. N, α : 0,104%.

im Filtrate 0,00252 » » α : 0,043

Summa 0,147%.

4. 5,045 gr. Molken wurden mit 3 ccm. Phosphorwolframsäurelösung gefällt:

Im Niederschlage war 0,00588 gr. N, α : 0,117%.

im Filtrate 0,00140 » » α : 0,028

Summa 0,145%.

Bei dem folgenden Versuche wurden grössere Portionen der Molken in Arbeit genommen, um den Unterschied in den

absoluten Mengen des zurückbleibenden Stickstoffes deutlicher hervortreten zu lassen.

10,023 gr. Molken enthielten im Ganzen 0,01316 gr. N, d: 0,1310/0.

Die zwei Portionen 1 und 2, jede von 25,00 gr. genau abgewogen, wurden gefällt, 1 mit 8 ccm., 2 mit 60 ccm. Gerbsäurelösung. Die Fällungen wurden sehr genau mit kaltem Wasser ausgewaschen, darauf Filtrat und Waschwasser erst in einer Porcellanschale, dann in einem Kjeldahl'schen Kölbchen eingedampft und als Stickstoffbestimmung behandelt. Es wurden gefunden:

1. 0,00644 gr. N, d: 0,0260/0.

2. 0,00630 » » d: 0,025 »

Wenn auch möglicherweise der erstere dieser Versuche (vorige Seite) in Richtung der genannten Annahme gedeutet werden konnte, so macht der letztere Versuch es nicht wahrscheinlich, dass in den Molken bedeutendere Mengen eines albumosenartigen Körpers mit der Eigenschaft, ganz oder theilweise von überschüssiger Gerbsäurelösung gelöst zu werden, vorhanden sind.

Gewöhnliche Milch verhält sich in dieser Hinsicht ganz in derselben Weise.

Der Stickstoffrest, welcher in der Milch nach dem Ausfällen der Eiweisskörper mit Gerbsäure zurückbleibt, gehört dem von Schmidt-Mülheim¹⁾ nachgewiesenen Harnstoffe, Lecithin und Hypoxanthin. Schmidt-Mülheim fand, dass die Milch pr. 100 ccm. gewöhnlich 40—50 mgr. N enthält, welche nicht eiweiss- oder peptonartigen Substanzen gehören. Nach zahlreichen Analysen von Milch darf ich dies bestätigen und kann hinzufügen, dass es sich gewöhnlich mit den Molken ebenso verhält; doch muss es auch bemerkt werden, dass die genannten Grenzwerte keineswegs absolut constant sind. Sowohl für Milch wie für Molken habe ich mehrmals beobachtet, dass diese Ziffer auf 0,03% der Milch sinken kann. Ich muss ausdrücklich hervorheben, dass dies nicht in einem weniger vollständigen Auswaschen des Gerbsäureniederschlages

1) Pflüger's Archiv für die ges. Physiologie, 1883, Bd. XXX, S. 379.

begründet ist, denn dieses wurde mit der grössten Sorgfalt ausgeführt. Auf der anderen Seite kann dieser Theil der Stickstoffmenge der Milch unter besonderen Verhältnissen auch die genannte obere Grenze überschreiten; so wird es z. B. aus dem letzten Abschnitte dieser Abhandlung hervorgehen, dass das Colostrum ca. 0,08% durch Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoff enthalten kann, welcher also als nicht eiweissartig zu betrachten ist.

Der Umstand, dass die Milch überhaupt andere stickstoffhaltige Bestandtheile als Eiweisssubstanz enthält, bewirkt natürlich, dass man nicht die gesammte Eiweissmenge durch Multiplication des Total-Stickstoffes mit dem gewöhnlichen Factor 6,37 berechnen kann. Sehr oft wird man freilich der Wahrheit ganz nahe kommen, wenn man für die Total-Eiweisssubstanz die Formel $(N - 0,4) \cdot 6,37$, wo N die totale Stickstoffmenge bedeutet, anwendet; aber es muss bestimmt erinnert werden, dass diese Formel aus oben angeführten Gründen keine absolute Gültigkeit beanspruchen kann, und es ist deshalb abzurathen, bei ausgedehnten wissenschaftlichen Untersuchungen die Eiweissmenge aus dem Total-Stickstoff zu berechnen.

Dagegen wird vorgeschlagen, die Total-Eiweissmenge nach der folgenden, ebenso leicht ausführbaren, wie schnellen Methode zu bestimmen. Ca. 3—5 gr. Milch (bei sehr eiweissreichem Colostrum nur ca. 2 gr., bei Molken ca. 10 gr.) werden mit einigen Volumen Wasser verdünnt, ein paar Tropfen Salzlösung (z. B. Natriumphosphat, Kochsalz, Magnesiumsulfat u. s. w.) zugesetzt und mit überschüssiger Gerbsäurelösung gefällt. Der ausgewaschene Niederschlag wird (nebst dem Filtrum mit bekanntem Stickstoffgehalte) direct zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl's Methode verwendet, und das Resultat wird entweder direct als «Total-Eiweiss-N» bezeichnet, oder durch Multiplication mit 6,37 zu Total-Eiweisssubstanz umgerechnet.

Gegenüber den gewöhnlich angewendeten Wägungsmethoden wird die eben beschriebene Methode mit Bezug auf Schnelligkeit in der Ausführung und Bequemlichkeit wesent-

liche Vortheile bieten, und da man wohl auf eine durchschnittliche Genauigkeit in der Stickstoffbestimmung von 0,01% N mit einem Maximalfehler von 0,02% rechnen darf, so entspricht dies, dass der begangene Fehler gewöhnlich unter 0,06% Eiweisssubstanz liegt und nie 0,13% überschreitet.

Bei den Wägungsmethoden lässt sich kaum eine grössere Genauigkeit erwarten. Denn sieht man auch von den Fehlerquellen ab, welche in dem Auswaschen des Niederschlages für überschüssige Fällungsmittel, Milchzucker u. dgl., in der Extraction des Fettes mit Aether¹⁾, in dem Trocknen zu constantem Gewichte und dem Wägen des Niederschlages und Filtrums, so wird man jedoch in solchen Fällen, wo der Niederschlag auf der Bildung einer unlöslichen Verbindung zwischen der Eiweisssubstanz und dem Fällungsmittel beruht (z. B. Metallsalze, Gerbsäure), mit der variablen Zusammensetzung des Niederschlages zu kämpfen haben. Selbst aber da, wo das Ausfällen so vorgenommen wird, dass keine neuen Verbindungen gebildet werden (Ausfällen der Hauptmasse der Eiweisssubstanz nach Puls-Stenberg oder nach Storch mit Weingeist, oder nach Hoppe-Seyler mit Säure und mittelst Coagulation in Kochhitze), so wird man doch hierbei immer nur ein partielles Ausfällen erhalten, und die Methode muss in Verbindung mit einer der vorigen Methoden zur Ausfällung des Restes angewendet werden. Bei diesem letzteren Theil wird man alsdann dieselben oben besprochenen Fehlerquellen und doppelte Mühe obendrein haben. Ausserdem wird man nie das Einäschern des Niederschlages umgehen können, und schon hierin wird eine nicht unwesentliche Quelle zu möglichen Fehlern liegen. Das in den Eiweisskörpern enthaltene Phosphor und Schwefel wird während dem Einäschern möglicherweise im reducirten Zustande verflüchtigt werden; es ist aber auch möglich, dass es zu Phosphorsäure und Schwefelsäure oxydirt wird, welches sich dann mit den Aschenbestandtheilen der Fällungen umsetzen wird, nach

¹⁾ Besonders bei abgerahmter Milch und ähnlichen fettarmen Producten mag hier eine wesentliche Fehlerquelle zu beachten sein.

Regeln, wovon es bis jetzt unmöglich ist, etwas Bestimmtes auszusprechen. Nehmen wir z. B. an, um uns einen Begriff davon zu machen, wie gross der hierbei entstehende Fehler werden kann, dass wir eine Milch mit 3,5% Eiweisssubstanz vor uns haben. Der Einfachheit halber berechnen wir die ganze Eiweissmenge als Kasein (ein Gehalt an Albumin würde nur die Schwefelmenge vermehren, die Phosphormenge etwas verringern). Es wird dann in der in 10 gr. Milch enthaltenen Kaseinmenge vorhanden sein:

0,0028 gr. Phosphor, welche 0,0064 gr. P_2O_5 bilden können,
und 0,0028 » Schwefel, » 0,0070 » SO_3 » »

Das Einäschern wird also eine Möglichkeit für die Bildung von 0,0134 gr. Säuren liefern, welche 0,134% der Milch ausmachen, und die gänzlich oder theilweise das Gewicht der Aschenbestandtheile vergrössern oder jedenfalls modificiren werden.

Eine Einwendung, die in gewissen Fällen wohl mit Recht gegen diese Bestimmung des Eiweissgehaltes mittelst dem Factor 6,37 gemacht werden kann, ist, dass dieser Factor nicht absolut constant ist. So lange es von gewöhnlicher normaler Milch, welche nicht wesentlich andere Eiweisskörper als Kasein und Albumin (eine Spur von Globulin wird kaum Bedeutung haben) enthält, deren Stickstoffgehalt dem genannten Factor genau entspricht, wird zwar diese Einwendung ohne Bedeutung sein. Dagegen lässt es sich wohl denken, dass unter besonderen Umständen, wie z. B. in Colostrum (siehe unten) und in Molken, welche letztere factisch Molkenprotein mit einem bedeutend niedrigeren Stickstoffgehalt (ca. 13,2%) als die übrigen Eiweisssubstanzen enthalten, und in solchen Milchpräparaten, welche relativ reich an Albumosen und Peptonen sind, welche vielleicht auch einen abweichenden Stickstoffgehalt haben, wird die Bedeutung des Factors 6,37 nicht ganz berechtigt sein. Für die practische Anwendung übrigens richtig ausgeführter Analysen wird jedoch die Einwendung von keiner Bedeutung sein, da es meist, und namentlich bei physiologischen Untersuchungen, von wenigstens ebenso grossem Interesse sein

wird, die Menge von «Eiweiss-Stickstoff», «Pepton-Stickstoff», «Kasein-Stickstoff» u. s. w. zu erhalten, als die Menge dieser Substanzen selbst.

3. Getrennte Bestimmung von Kasein und Laktalbumin in der Milch.

Die zuerst von Millon und Comaille¹⁾ eingeführte und später von Hoppe-Seyler²⁾ weiter ausgearbeitete Methode zur Bestimmung des Kaseins durch Fällen der mit Wasser hinlänglich verdünnten Milch mit verdünnter Essigsäure kann keine exacte Werthe geben, weil die Ausfällung des Kaseins mit dem genannten Reagense nur sehr unvollständig ist. Dasselbe gilt auch von der Ausfällung des Kaseins mittelst Schwefelsäure nach Frenzel und Weyl³⁾. Noch weniger kann die Coagulation der Milch mit Lab, wie Manetti und Musso⁴⁾ es vorgeschlagen haben, und die Bestimmung des ausgeschiedenen Coagulums nach dessen Zertheilung, Auswaschen, Trocknen und Einäschern zuverlässige Kaseinbestimmungen geben; theils wird nämlich stets etwas unangefällte Käsemasse (Parakasein) oder unverändertes Kasein in den Molken zurückbleiben, theils wird dieser Theil von Factoren abhängen, deren Bedeutung noch bis lange nicht aufgeklärt ist.

Anders verhält es sich mit der Ausfällung des Kaseins mittelst Magnesiumsulfat, welches für diesen Zweck zum ersten Male von Mitscherlich in 1847 benutzt worden sein soll⁵⁾. Später ist die Methode in verschiedenen Modificationen von Tolmatscheff⁶⁾, Makris⁷⁾ und Hoppe-Seyler⁸⁾ ange-

1) Comptes rendus, t. 59, S. 396.

2) Handbuch der physiol.-chem. Analyse, 5. Aufl., 1883, S. 486.

3) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IX, S. 246.

4) Zeitschr. f. analyt. Chemie, Bd. XVI, 1877, S. 402.

5) Makris, Die Eiweisskörper der Kuh- und Menschenmilch, 1876, S. 20.

6) Hoppe-Seyler, Medic.-chem. Untersuchungen, Bd. II, 1867.

7) L. c., S. 21.

8) Handbuch d. physiolog.-chemischen Analysen, 4. - 5. Aufl.

wendet. Letzterer wendet sie doch nur indirect zur Kaseinbestimmung an, indem er wohl das Kasein durch Sättigen mit Magnesiumsulfat in Substanz ausfällt, aber nur das Filtrat von dieser Fällung zur Bestimmung des Albumins (und Peptons) benutzt, und dann das Kasein als Differenz zwischen diesem Resultate und der mittelst einer besonderen Bestimmung ermittelten Totaleiweissmenge berechnet.

Stenberg¹⁾ unterwarf diese Methode einer kritischen Prüfung, besonders mit Bezug auf die Frage, ob ein Verlust an Albumin entweder durch Mitreissen in die Fällung mit Magnesiumsulfat, oder auf anderem Wege geschieht. Von einem mit Wasser verdünnten Blutserum, welches durch Sättigen mit Magnesiumsulfat von Paraglobulin befreit war, wurden zwei gleich grosse Portionen à 10 cbcm. abgemessen; in der einen wurde die Albuminmenge direct durch Coagulation bei Siedetemperatur und Wägung des ausgeschiedenen Niederschlages mit Abzug der Aschenmenge bestimmt. Die zweite Portion wurde dagegen mit einer Kaseinlösung vermischt, darauf das Kasein aus der Mischung durch Sättigen mit Magnesiumsulfat gefällt und das Albumin wieder im Filtrate wie vorher bestimmt. Für Niederschläge, deren Gewicht zwischen 23 und 47 mgr. ausmachte, fand Stenberg in dieser Weise ein Deficit von 2,3 bis 9,9 mgr. Wenn diese Quantitäten auch nur klein sind, so können sie doch bis ca. $\frac{1}{6}$ der ganzen Albuminmenge ausmachen.

Ogleich die Versuche Stenberg's mit nachfolgender Genauigkeit ausgeführt waren, verdient die Frage doch wohl eine wiederholte Prüfung. Theils lässt es sich nämlich gegen den Versuch Stenberg's einwenden, dass er hierbei Serumalbumin benutzte, welches sich ja möglicherweise anders als das Laktalbumin verhalten kann, theils kann man sich auch die noch mehr bedeutende und mehr wahrscheinliche Einwirkung denken, dass die Albuminbestimmung durch Coagulation nicht absolut genau sei. Wie bekannt, hat Ham-

¹⁾ Nordiskt medicinskt Arkiv, 1882.

marsten sowohl für das Kasein¹⁾ wie für das Fibrinogen²⁾ bewiesen, dass die Coagulation, ob dieselbe unter Einwirkung von Ferment oder durch Wärme geschieht, in einer Spaltung, in einem unlöslichen Theil, der sich als Coagulum ausscheidet, und in einem mehr leicht löslichen Bestandtheil, besteht. Die Annahme liegt dann nahe, dass etwas Aehnliches auch bei der Coagulation der übrigen Eiweisskörper geschieht, so dass die Fällung nicht absolut vollständig wird.

Betrachten wir erst die Frage von der Vollständigkeit der Ausfällung des Kaseins. Makris³⁾ hat früher die Vollständigkeit der Fällung mittelst Magnesiumsulfat untersucht, aber er probirte nur einmal das salzgesättigte Filtrat vom Kaseinniederschlag, welches er mit Essigsäure ansäuerte; es kam hierbei erst beim Erhitzen zum Kochen ein Niederschlag. Ausser dem Magnesiumsulfat ist auch Kochsalz (in kalkhaltigem Zustande) häufig zum Ausfällen des Kaseins aus der Milch benutzt worden⁴⁾. Auch das Chlorcalcium has das Vermögen, das Kasein ausfällen zu können, aber es fällt dann auch gleichzeitig das Laktalbumin, so dass man hiermit keine Trennung der beiden Eiweisskörper erhält. Dasselbe gilt auch von Chlorbaryum, und die mit diesen beiden letztgenannten Salzen erzeugten Fällungen werden beim Verweilen in der Flüssigkeit in einigen Tagen unlöslich in Wasser⁵⁾.

Von anderen Salzen finde ich, dass Chlorammonium oder Chlorkalium als Substanz in eine Lösung von reinem Kasein in Wasser mit etwas Natriumphosphat hineingebracht, keine Fällung bei gewöhnlicher Temperatur oder Körperwärme

1) Upsala läkareförenings förhandlingar, 1874.

2) Pflüger's Archiv, Bd. XXX, S. 437.

3) L. c., S. 21.

4) Hammarsten in Upsala läkareförenings förhandlingar, 1874. — Sebelien, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IX, S. 446.

5) Für die Kenntniss hiervon bin ich ursprüngliche Mittheilung von Herrn Prof. Hammarsten Dank schuldig. — Später hat S. Lewith Aehnliches für die Eiweisskörper des Blutserums nachgewiesen (Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., Bd. XXIV, 1887).

hervorzubringen im Stande sind; beim weiteren Erwärmen (bis ca. 60—70° C.) wird sich dagegen ein Niederschlag ausscheiden, der nicht wieder beim Abkühlen der Flüssigkeit verschwindet. Versetzt man darauf aber die Mischung mit Wasser in Ueberschuss, lösen die Fällungen sich nach hinreichendem Stehen vollständig auf.

Von den besprochenen Salzen scheinen also das Magnesiumsulfat und das Kochsalz am besten für eine Trennung des Kaseins von dem Laktalbumine der Milch geeignet. Die Salze werden am besten als ein halbflüssiger Krystallbrei benutzt, da dieser sich leichter als die lufttrockenen Krystalle löst.

1. Reines Kasein wurde nun in Wasser unter Zusatz von einer minimalen Menge Natron gelöst, darauf mit so viel von verdünnten Lösungen von Chlorecalcium und Natriumphosphat versetzt, dass die milchweisse Farbe (aus Kaseincalciumphosphat) hervortrat. Durch directe Stickstoffbestimmung des mit Gerbsäure ausgefällten Kaseins wurde ein Gehalt von beziehungsweise 0,294% und 0,288% Stickstoff gefunden (Tab. S. 143, 3). Mit dieser Lösung wurde nun folgender Versuch angestellt:

- a) 10 ccm. wurden mit 20 ccm. gesättigter Kochsalzlösung und darauf Kochsalz in Substanz bis zur Sättigung vermischt. Nach dem Filtriren und Auswaschen mit gesättigter Kochsalzlösung wurde das Filtrat mit Wasser verdünnt und mit Gerbsäurelösung versetzt. Beim Stehen zum nächsten Tage hatte sich ein kleiner Niederschlag gesammelt, worin 0,00014 gr. N waren, d: 0,0014%.
- b) Andere 10 ccm. derselben Lösung wurden in ähnlicher Weise mit Magnesiumsulfat und einer gesättigten Lösung dieses Salzes behandelt. Die ausgewaschene Salzfällung enthielt 0,0294 gr. N, d: 0,294%. — Aus dem Filtrate schied Gerbsäure zwar eine kleine Fällung aus, die jedoch wahrscheinlich durch die Einwirkung der Gerbsäurelösung auf die Salzlösung entstanden war, denn sie zeigte sich als ganz stickstofffrei.

2. In einer Lösung von reinem Kasein in Wasser unter Zusatz von einer minimalen Menge Alkali wurde durch directe Stickstoffbestimmung gefunden 0,221% N, durch Stickstoff-

bestimmung in der mit Gerbsäure direct ausgeschiedenen Kaseinfällung 0,224% N.

- a) Von dieser Lösung wurden 10 ccm. in oben beschriebener Weise mit Kochsalz in Substanz gefällt. Im Niederschlage wurden 0,0218 gr. N gefunden, c: 0,218%. Aus dem Filtrate schied Gerbsäure keinen stickstoffhaltigen Niederschlag ab.
- b) 10 ccm. wurden in gleicher Weise mit Magnesiumsulfat behandelt. Der Niederschlag enthielt 0,0221 gr. N, c: 0,221%. — Aus dem Filtrate wurde mit Gerbsäure eine Fällung erhalten, worin 0,00041 gr. N, c: 0,004%.

Es wird hieraus erlaubt sein zu schliessen, dass sowohl das Kochsalz wie das Magnesiumsulfat in Substanz das Kasein vollständig aus seiner Lösung auszufällen im Stande ist, denn diejenigen Spuren von Stickstoff, welche in einzelnen Fällen im Filtrate nachgewiesen werden konnten, lassen sich gewiss eher aus einem zufälligen Ammoniakgehalt der Laboratoriumsluft als aus einer weniger vollständigen Ausfällung der Eiweisssubstanz herleiten. Wo kein specieller Grund zum anderweitigen Verfahren vorhanden ist, wird man doch als Regel, in sofern man den Kaseingehalt überhaupt durch die Stickstoffbestimmung aus dem ausgesalzten Niederschlag¹⁾ ermitteln will, das Magnesiumsulfat dem Kochsalze vorziehen. Im letzteren Falle wird man nämlich bei Behandlung des salzhaltigen Niederschlages mit concentrirter Schwefelsäure eine heftige Entwicklung von Chlorwasserstoffgas erhalten, wodurch leicht die Bestimmung verloren gehen kann.

Die Vollständigkeit der Ausfällung des Albumins mit Gerbsäure oder Phosphorwolframsäure ist schon oben bewiesen worden. Makris (l. c., S. 21) hat untersucht, in wiefern das Laktalbumin durch Coagulation mit schwacher Essigsäure bei

¹⁾ Es lässt sich nicht ausführen, die ausgesalzten Niederschläge durch directe Wägung zu bestimmen. Beim Trocknen der Kochsalzfällung wird das Salz eine genirende Neigung zum «Kriechen» haben; und sowohl bei der Kochsalz- wie bei der Magnesiumsulfatfällung wird man unüberwindbaren Schwierigkeiten begegnen, um das Salz zu einem constanten, bekannten Wassergehalt zu trocknen. Die Bestimmung der Stickstoffmenge bietet daher auch hier die grösste Genauigkeit und die grösste Bequemlichkeit.

Siedetemperatur vollständig ausgefällt wird. Er betrachtet die Ausfällung als vollständig, wenn gelbes Blutlaugensalz in dem klaren Filtrate keinen weiteren Niederschlag erzeugt. Diese Reaction kann doch nicht als hinreichend fein für die Entscheidung der Frage gelten, und namentlich wird die Gegenwart von relativ wenig Eiweisssubstanz und grossen Salzmengen in der von Makris untersuchten Flüssigkeit das Hervortreten der Reaction gehindert haben. In den klaren Filtraten von Eiweisslösungen, die in der Hitze coagulirt waren, habe ich stets starke Reactionen sowohl mit Gerbsäure wie mit Phosphorwolframsäurelösung erhalten, welches darauf hindeutet, dass die Eiweisssubstanz beim Kochen nicht absolut vollständig gefällt wird, — dies mag nun bedeuten, dass der im Filtrate restirende Theil als ein nicht ausgefallter unveränderter Rest, oder eher als ein bei der Coagulation abgetrennter leicht löslicher Bestandtheil zu betrachten ist. Die folgenden quantitativen Versuche bestätigen dies.

In einer Lösung von reinem Ovalbumin wurde die Stickstoffmenge direct in 3,483 gr. Lösung zu 0,00742 gr., α : 0,213% N bestimmt; durch Fällen mit Gerbsäure wurden aus 10,017 gr. Lösung 0,0196 gr. Stickstoff, α : 0,196% erhalten.

10,006 gr. der Lösung wurde beim Sieden mit etwas Essigsäure coagulirt. Die Fällung enthielt 0,0182 gr. N, d. h. 0,182%. — Aus dem Filtrate hiervon schlug Phosphorwolframsäure 0,00238 gr. N, α : 0,023% nieder. In diesem Versuche hatten also ca. 11—12% der ganzen Stickstoffmenge sich der fällenden Wirkung der Coagulation entzogen.

Eine andere Lösung derselben Art zeigte das folgende Resultat:

3,211 gr. gaben bei directer Bestimmung 0,03794 gr. N, α : 1,18%.

5,541 gr. gaben im Gerbsäureniederschlag 0,0672 gr. N, α : 1,177%.

10,865 gr. wurden bei Kochhitze mit etwas Essigsäure coagulirt. Es fanden sich im Coagulum 0,1134 gr. N, α : 1,044%¹⁾.

1) Während der Destillation der grossen Ammoniakmenge wurde hier ein kleiner Verlust an Stickstoff erlitten.

Aus dem Filtrate schlug Phosphorwolframsäure 0,00854 gr. N, ρ : 0,079% nieder. Das Filtrat von diesem letztgenannten Niederschlag enthält noch nur 0,00014 gr. N, also 0,001%. — Ca. 7% der ganzen Stickstoffmenge haben sich in diesem Falle der Coagulation entzogen.

Von einer Laktalbuminlösung, welche keine fremden stickstoffhaltigen Substanzen enthält, wurden 10 ccm. durch Kochen mit einer Spur Essigsäure coaguliert. Das Coagulum enthielt 0,0126 gr. Stickstoff, ρ : 0,126%. Aus dem Filtrate wurden mittelst Gerbsäure noch 0,00168 gr. Stickstoff, ρ : 0,0168%, oder ca. 12% der totalen Stickstoffmenge ausgeschieden.

Um nun die Brauchbarkeit der Ausfällung mit Magnesiumsulfat zum Trennen der Haupt-Eiweisssubstanzen der Milch zu untersuchen, wurde eine Kaseinlösung durch Auflösen von reinem Kasein in Wasser unter Zusatz von etwas Natriumphosphat bereitet, und mit kleinen Mengen einer verdünnten Chlorcalciumlösung vorsichtig versetzt zum Hervortreten der für das genuine Milchkasein charakteristischen weissen Färbung. In dieser Lösung wurde der Stickstoffgehalt bestimmt. — In einer Lösung von reinem Laktalbumin, welche durch Dialyse einigermaßen salzarm gemacht war, wurde ebenfalls der Stickstoffgehalt bestimmt. Darauf wurden genau abgemessene Portionen der beiden Lösungen gemischt, und von der Mischung wurden Portionen von ca. 10 ccm. genau abgewogen und darauf wie natürliche Milch behandelt. Es wurde nämlich die zu analysierende Portion einige mal mit seinem gleichen Volumen einer gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat verdünnt und darauf dasselbe Salz in fester Form zu Sättigung hinzugesetzt. Nach dem Auswaschen des Niederschlages mit gesättigter Salzlösung wurde seine Stickstoffmenge bestimmt («Kasein-N»), und aus dem Filtrate nach dessen Verdünnen mit Wasser mittelst Gerbsäure oder Phosphorwolframsäure ein Niederschlag ausgeschieden, dessen Stickstoffmenge das «Albumin-N» ausdrückt.

I. 4,180 gr. Kaseinlösung enthalten 0,01862 gr. N, ρ : 0,445%.
 5,742 » Albuminlösung » 0,01316 » » ρ : 0,229 »

Beim Mischen von 20 ccm. Kaseinlösung mit 30 ccm. Albuminlösung wurde also eine Lösung erhalten mit im

Ganzen $0,316\%$ N, und speciell $0,174\%$ Kasein-N und $0,138\%$ Albumin-N.

1. 10,125 gr. Lösung gaben im Magnesiumsulfat-Niederschlag $0,01876$ gr. N, $\text{d.}:$ $0,185\%$ Kasein-N; und im Filtrate wurden mit Gerbsäure $0,01428$ gr. N, $\text{d.}:$ $0,142\%$ Albumin-N gefällt; also im Ganzen $0,317\%$.
2. 10,180 gr. Lösung gaben im Niederschlage mit Magnesiumsulfat $0,01750$ gr., $\text{d.}:$ $0,172\%$ Kasein-N; und im Filtrate hiervon fällte Gerbsäure $0,0151$ gr., $\text{d.}:$ $0,151\%$ Albumin aus, also im Ganzen $0,323\%$ N.

II. 4,862 gr. Kaseinlösung enthielt $0,01610$ gr. N, $\text{d.}:$ $0,331\%$.
 10,193 » Albuminlösung » » $0,00686$ » » $\text{d.}:$ $0,067\%$

Durch Mischen gleicher Raumtheile dieser beiden Lösungen wurde eine Lösung mit $0,200\%$ Total-Stickstoff, $0,166\%$ Kasein-N und $0,034\%$ Albumin-N erhalten.

$9,780$ gr. Lösung wurden mit Magnesiumsulfat gefällt; der Niederschlag enthielt $0,01568$ gr., $\text{d.}:$ $0,160\%$ Kasein-N. Im Filtrate wurde mit Phosphorwolframsäure eine Fällung erhalten, worin $0,0042$ gr. N, $\text{d.}:$ $0,043\%$ Albumin-N. Im Ganzen also $0,203\%$ N gefunden.

Die Trennung der beiden Eiweisskörper zeigte sich somit als möglichst vollständig, und die Uebereinstimmung zwischen den gefundenen und berechneten Werthen ist so vollständig, als man nach sorgfältig ausgeführten quantitativen Analysen erwarten kann.

In diesem Zusammenhange müssen wir noch ein Verhalten berühren, welches in den letzten Jahren von Duclaux¹⁾ hervorgehoben ist, und welches, wenn es wirklich von der Art ist, wie dieser Verfasser es angiebt, die ganze oben entwickelte und begründete Trennungsmethode der beiden wesentlichsten Eiweisskörper der Milch vernichten würde.

Duclaux stellt (l. c., S. 31) die beiden Fragen auf:

1. Enthält der mit Magnesiumsulfat hervorgebrachte Niederschlag sämtliches Kasein der Milch? und
2. Enthält dieser Niederschlag ausser dem Kasein keine andere Eiweisssubstanz?

Die erstere dieser Fragen beantwortet Duclaux mit einem Nein! « car le liquide filtré, chauffé pour séparer l'albu-

¹⁾ Duclaux, Le lait. Paris 1887.

mine, filtré à nouveau, et additionné d'une goutte d'acide acétique donne encore un dépôt floconneux». Die oben angeführten (S. 163—164) Versuche, welche mit reinem Kasein angestellt wurden, zeigen hinreichend, dass die Ausfällung vollständig ist, und wenn Duclaux nichtsdestoweniger Kasein im Filtrate wiederfindet, so mag dies darin liegen, dass er vielleicht bei Anwendung von krystallisirtem Magnesiumsulfat in trockner Form keine vollständige Sättigung erhalten hat. Die lufttrockenen Krystalle lösen sich verhältnissmässig langsam in der Milch, weshalb man viel rascher das Ziel erreicht bei Anwendung des halbflüssigen Krystallbreis. Eher ist doch vielleicht die Ursache darin zu suchen, dass Duclaux nicht mit reinen Kaseinlösungen, sondern mit Milch experimentirte, und da das Albumin nicht vollständig durch Coagulation in Siedehitze zu entfernen ist, und es nicht in Duclaux's Schrift angegeben ist, dass er das Filtrat vom Magnesiumsulfat-Niederschlag mit Wasser verdünnt hat, so wird der geringe Eiweissrest, welcher nach der Coagulation zurückbleibt, einen Niederschlag mit Essigsäure in der salzgesättigten Lösung hervorbringen. Es ist dies indessen kein Kriterium auf Kasein, sondern eine Reaction, welche nicht nur allen eigentlichen Eiweisskörpern, sondern auch den Albumosen zukömmt.

Die andere der oben genannten Fragen beantwortet Duclaux bejahend: «car si on le redissout dans l'eau, on obtient un liquide opaque comme du lait, passant bien au travers des filtres, et se troublant abondamment avant l'ébullition comme les liquides albumineux. Si même on a ajouté assez d'eau pour que le volume soit égal à peu près à deux fois et demie le volume du lait primitif, cette dissolution, qui, d'après l'hypothèse acceptée plus haut, ne devrait renfermer que de la caseïne, se trouble à 60° comme l'albumine, et abandonne la presque totalité de ce qu'elle renfermait» (l. c.).

Obgleich ich in meiner früheren Arbeit gezeigt habe, dass das Laktalbumin durchaus nicht durch Sättigen seiner Lösungen mit Magnesiumsulfat gefällt wird¹⁾, und dass Kasein-

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1885, Bd. IX, S. 456.

lösungen, selbst wenn sie nicht ganz rein sind, nicht durch Erhitzen zur Siedetemperatur zum Coaguliren zu bringen sind, wenn die Lösung bis 10% Kochsalz enthält, so erschien mir doch die Bestimmtheit, womit Duclaux seine Erfahrungen hervorhebt, von so grossem Gewicht, dass es untersucht zu werden verdiente, ob vielleicht das Magnesiumsulfat in dieser Beziehung eine andere Wirkung als das Kochsalz habe. Es liess sich ja auch denken, dass wenn man, wie Duclaux, statt mit reinen Kaseinlösungen, mit Milch experimentirt, könne die Spur von Laktoglobulin, die in der Milch vorhanden ist, und die vom Magnesiumsulfate mit dem Kasein zusammen gefällt wird, beim Erhitzen der wässerigen Lösung des Niederschlages eine Coagulation hervorrufen. Diese letztere Annahme war doch nur sehr wenig wahrscheinlich, denn die Laktoglobulinmenge der Milch ist kaum grösser als die Globulinmenge, welche bei meinen in 1885 beschriebenen Coagulationsversuchen mit Kasein, welches mit Blutserumbestandtheilen verunreinigt war, gegenwärtig war. Die von Duclaux beschriebene Coagulation scheint indessen ganz bedeutend zu sein und nicht nur auf einer blossen Spur von Eiweiss zu beruhen.

Versuche, welche angestellt wurden mit Lösungen von Kasein, welches mit Magnesiumsulfat aus einer Lösung von reinem säurefreiem Kasein in einer minimalen Alkalimenge ausgesalzen war, gaben jedoch ebenso wenig eine Coagulation wie die früheren Versuche mit kochsalzhaltigen Lösungen; bei beträchtlicher Salzmenge trat zwar eine Trübung der Flüssigkeit ein, aber es war nie eine Spur von Coagulation, und nach dem Abkühlen war die Flüssigkeit wieder ganz klar.

Ich habe danach wiederholt versucht, völlig süsse (d. h. nicht gesäuerte) Milch sowohl mit Kochsalz wie mit Magnesiumsulfat zu sättigen, nachdem die Milch erst mit dem doppelten Volumen der betreffenden Salzlösung verdünnt war. Die Fällung wurde abfiltrirt und mehrere mal mit gesättigter Salzlösung gewaschen, danach von dem Filtrum abgeschabt und zugleich mit dem anhängenden Salzüberschusse in so viel Wasser gelöst, dass die Lösung ungefähr zwei und ein halbes

mal so viel wie das Volumen der Milch ausmacht. Nach Filtriren von dem zurückbleibenden Fette bekommt man eine mehr oder weniger opalisirende, aber sonst klare Flüssigkeit, die aber nicht mal durch heftiges Kochen zur Coagulation gebracht werden konnte. Dagegen erschien, schon bedeutend unter der Siedehitze, aber sonst verschieden nach dem Salzgehalte, eine starke Trübung; die Flüssigkeit wird milchweiss und total undurchsichtig, aber beim Abkühlen klärt sie sich wieder auf; höchstens findet sich am Boden des Reagirgläschens etwas sandartiger Bodensatz, welcher wahrscheinlich der Einwirkung des vorhandenen Kochsalz auf das Kasein zuzuschreiben ist, welcher aber nie mit einem flockigen Eiweisscoagulum verwechselt werden kann.

Ist die Milch dagegen sauer geworden, so wird man möglicherweise beim Sättigen mit Salz ausser dem Kasein auch eine Ausscheidung von etwas Laktalbumin bekommen. Jedoch war ein solches Coagulum, das in dieser Weise aus einer Milch erhalten war, welche zwar einen Tag alt war, aber doch nur eine schwach saure Reaction angenommen hatte, so unbedeutend, dass es leicht übersehen werden konnte, und jedenfalls nicht mehr wie eine Spur ausmachte. Es ist mir dann kein anderer Grund zu dem Unterschiede zwischen den Beobachtungen des französischen Forschers und den meinigen übrig, als die Annahme, dass Duclaux nach dem Aussalzen des Kaseins aus der Milch nicht das Laktalbumin durch Waschen mit einer gesättigten Salzlösung genügend entfernt hat. Namentlich wenn man unterlässt, die Milch vor dem Hinzufügen des festen Salzes einige male zu verdünnen, wird der unausgewaschene Niederschlag leicht so viel Albumin enthalten, dass man bei Ausführung des Coagulationsversuches in oben beschriebener Weise eine deutliche Ausscheidung von coagulirten Eiweissflocken, [die nicht wieder beim Abkühlen der Flüssigkeit verschwinden, bekommen kann.

Die Berechtigung der Benutzung des Magnesiumsulfats zur quantitativen Trennung des Kaseins und Albumins der Milch scheint nach den jetzt angeführten Thatsachen ein-

leuchtend zu sein. Betreffend der Form, wonach die Bestimmung geschieht, so ist hier in noch höherem Grade als bei der Bestimmung des Totaleiweisses die indirecte Bestimmungsweise durch die Stickstoffmenge der Niederschläge, die also den «Kasein-Stickstoff» und den «Albumin-Stickstoff» liefert, den Wägungen der Niederschläge vorzuziehen. Was das Kasein betrifft, geht dieses schon aus dem oben, S. 164, Anm., Gesagten hervor; für das Albumin ist es eine Folge theils aus der inconstanten Zusammensetzung der Fällungen mit Gerbsäure und Phosphorwolframsäure, theils aus der unvollständigen Ausfällung durch Coagulation in Hitze. Es liess sich freilich der grösste Theil des Albumins durch Erhitzen coaguliren, und nach Bestimmung dieses Niederschlages durch Wägung und Einäschern konnte man den Rest aus dem Filtrat mit einem der vollständigeren Eiweissfällungsmittel ausfällen und durch den Stickstoffgehalt bestimmen. Dabei bekommt man aber nur vergrösserte Mühe und kaum grössere Genauigkeit, so lange man nicht weiss, ob der bei der Coagulation ungefällte Rest wirklich Albumin ist, oder vielleicht eher ein mit dem Molkenprotein analoges Zersetzungsproduct des Laktalbumins mit einem Stickstoffgehalt, der von dem des letzteren bedeutend abweicht.

4. Die Eiweisskörper des Colostrums.

Es wird nicht ohne Bedeutung sein, mittelst der im vorigen Abschnitte begründeten Methode das Colostrum, dieses sowohl in physiologischer wie in milchtechnischer Hinsicht so interessante Product, das so bedeutend von normaler Milch abweicht, einer näheren Untersuchung mit Hinsicht auf die darin enthaltenen Eiweisskörper zu unterwerfen. Die Literatur enthält die meist variirenden und gegenseitig streitenden Angaben über die Zusammensetzung des Colostrums.

Einige Verfasser, wie Grotenfelt¹⁾, sprechen dem Colostrum vollständig jeden Gehalt an Kasein ab und schreiben den

¹⁾ Handledning i mejerihushållning, Stockh. 1881, S. 32. — 2^{dra} uppl., 1886, S. 29.

ganzen Eiweissgehalt auf das Conto des Albumins. König¹⁾ führt als Mittelwerth einer Menge übrigen sehr heterogenen Analysen von Colostrum 4,65% Kasein und 13,62% Albumin an. Bei Fleischmann²⁾ finden wir als Durchschnitt für Colostrum der ersten Melkung einen Gehalt von 7,3% Kasein und 7,5% Albumin angegeben. Eugling³⁾ führte selbstständige Analysen von Colostrum erster Melkung von einer ziemlich grossen Anzahl Kühen aus, und fand die Kaseinmenge zwischen 2,64—7,14%, die Albuminmenge zwischen 11,18—20,21% variirend. Hansen und Schrodt⁴⁾ fanden einmal im Colostrum 7,57% Kasein und 5,45% Albumin, und ein andermal 3,79% Kasein und 0,04% Albumin.

Die meisten Verfasser sind also über das Vorhandensein des Kaseins im Colostrum einig, und die Vermuthung Grotenfelt's beruht wahrscheinlich nur darauf, dass die Colostralmilch nicht unmittelbar durch Lab zu verkäsen ist. Uebrigens hat schon Eugling (l. c.) gezeigt, dass das Colostrum nach passender Verdünnung mit Wasser durch Lab dick gelegt werden kann, und ich selbst habe Gelegenheit gehabt, aus Colostrum nach Hammarsten's gewöhnlicher Methode Kasein zu präpariren (doch wird hierbei etwas mehr Essigsäure zur Ausfällung des Kaseins als bei gewöhnlicher Milch erfordert), und mich von seiner Identität mit dem gewöhnlichen Milchkasein überzeugt⁵⁾).

Ogleich keine besondere Uebereinstimmung zu erwarten ist in den Analysen eines Secretes, das an und für sich so verschiedenartig ist wie das Colostrum, so darf man doch vielleicht wagen, zum grossen Theil die Ursache zu den bedeutenden Nichtübereinstimmungen zwischen den genannten älteren Analysen darin zu suchen, dass dieselben oft nach höchst unvollkommenen, oft nicht einmal näher beschriebenen

1) Nahrungs- u. Genussmittel, 2. Aufl., II. Bd., S. 257.

2) Handbuch des Molkereiwesens, S. 56.

3) Petersen's Forschungen a. d. Gebiete d. Viehhaltung, Bd. I, 1878, S. 92.

4) Landwirthschaftl. Versuchsstationen, 1885, Bd. XXXI, S. 74 u. 75.

5) Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1885, Bd. IX.

Methoden ausgeführt wurden. Der Zweck mit den jetzt darzulegenden Analysen ist keineswegs, eine normale Durchschnittszusammensetzung für Colostrum zu geben, denn dieselbe wird sicherlich ganz ausserordentlich variiren, sowohl mit der Individualität, der Rasse, dem Klima und der Fütterung, sondern es wird nur beabsichtigt, einige zuverlässige Beispiele zu geben, wie der Eiweissgehalt des Colostrums beschaffen sein kann. Es lag zugleich nahe, zu untersuchen, ob nicht ein Theil der grossen Eiweissmenge, welche in den älteren Analysen als Albumin aufgeführt ist, vielleicht eher einem anderen Eiweisskörper, speciell dem Globulin zugehörig sei.

Eugling¹⁾ fand bei seinen Untersuchungen ca. 0,3% Globulin beim Fällen der Molken von dem mit Wasser verdünnten und mit Lab coagulirten Colostrum mit einem Kohlensäurestrom, und ich selbst habe früher rein qualitativ geschätzt, dass das Globulin im Colostrum in etwas grösserer Menge als in gewöhnlicher Milch vorhanden ist²⁾. Vielleicht mag das von Eugling gefundene Resultat zu niedrig sein, denn das Globulin wird, wie bekannt, nur sehr unvollständig durch Verdünnen mit Wasser und Durchleiten von Kohlensäure gefällt; doch wäre es auch möglich, dass der Niederschlag Eugling's zum Theil aus einem Rest von Kasein und Parakasein, welches bei der Sättigung unausgefällt blieb, bestehe und also zu hoch wäre. Leider scheint es nicht möglich, absolute Bestimmungen des Globulins zu bekommen, so lange man vollständige Trennungsmethoden zwischen dem Kasein und Globulin entbehren muss. Jedoch wird schon der Minimalwerth, den man bekommt, wenn man erst alles Kasein nebst einem Theil des Globulins durch Sättigen mit Kochsalz ausscheidet, und darauf den Rest des Globulins durch Sättigen des Filtrats mit Magnesiumsulfat fällt und für sich bestimmt, eine weit grössere Globulinmenge zeigen, als nach dem früher Bekannten zu erwarten war.

1) L. c., S. 96.

2) Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1885, Bd. IX.

1. Colostrum 2^{ter} Melkung. 12./3. 1887.

Die Total-Stickstoffmenge wurde in 3,079 gr. Milch zu 0,03794 gr.,
 ♂: 1,232% N bestimmt.

10,180 gr. Milch wurden mit 2 Volumina gesättigter Magnesiumsulfat-
 lösung verdünnt und dann mit Sulfat in Substanz gesättigt. Die
 Fällung enthielt 0,09044 gr. N, ♂: 0,887%^o, der totalen Kasein- und
 Globulinmenge angehörend.

Das Filtrat hiervon wurde nach Verdünnen mit Gerbsäure gefällt
 und lieferte hierbei 0,0126 gr. N, ♂: 0,124%^o Albumin-Stickstoff.

10,235 gr. Milch wurden mit dem doppelten Volumen gesättigter Koch-
 salzlösung verdünnt und mit Kochsalz in Substanz gesättigt. Das
 Filtrat vom hierdurch entstehenden Niederschlage wurde mit Magne-
 siumsulfat gesättigt und im Niederschlage hiermit wurden gefunden
 0,01022 gr. N, ♂: 0,100%^o Globulin-Stickstoff.

Das Filtrat hiervon wurde mit Wasser verdünnt und mit Gerb-
 säurelösung gefällt, der Niederschlag enthielt 0,1414 gr. N, ♂: 0,138%^o
 Albumin-Stickstoff, von der vorigen Bestimmung nicht sehr ab-
 weichend.

Es liess sich denken, dass eine mehr vollständige Tren-
 nung des Globulins vom Kasein durch eine wiederholte Lösung
 der Kochsalzfällung in Wasser und wiederholte Ausfällung mit
 Salz in Substanz zu erhalten wäre, wobei denn das Kasein
 stets vollständig, das Globulin dagegen nur partiell auszufällen
 wäre. Wegen der nahen Uebereinstimmung aber, welche in
 fast allen Löslichkeitsverhältnissen zwischen dem Laktoglobulin
 und dem Serumglobulin besteht, wird dieses doch kaum ge-
 lingen; denn wie bekannt¹⁾, geht das Globulin durch solches
 wiederholtes Lösen und Ausfällen leicht in eine Modification
 über, die sich durch grössere Fällbarkeit auszeichnet und
 namentlich ebenso wie das Kasein durch Kochsalz vollständig
 gefällt wird.

Dagegen liess es sich vielleicht eher erwarten, eine einiger-
 massen approximirte Maximalbestimmung des Globulins zu er-
 halten, durch eine besondere Stickstoffbestimmung des Kaseins,
 welches man mittelst Essigsäure aus dem mit Wasser ver-
 dünnten Colostrum ausfällen kann, und durch die Subtraction
 dieses Resultates von der ganzen mit Magnesiumsulfat fäll-

¹⁾ Hammarsten in Pflüger's Archiv, Bd. XVIII, S. 55.

baren Stickstoffmenge; der Unterschied zwischen diesen beiden Stickstoffbestimmungen würde dann am nächsten die Menge des Globulin-Stickstoffes angeben. Zwar wird das Globulin wie das Kasein von Essigsäure gefällt, aber die Säurequantität, welche zur Ausfällung dieser beiden Eiweisskörper erforderlich ist, ist so verschieden, dass das Globulin längst wieder im Säureüberschusse gelöst sein wird, wenn der grossflockige Kasein-Niederschlag sich zu bilden anfängt, wozu, wie schon genannt, besonders bei Colostralmilch ziemlich viel Essigsäure erforderlich ist (ca. 1% Essigsäureanhydrid, gegen 0,075—0,1% bei normaler Milch). Indessen ist ja die Ausfällung des Kaseins durch Säure lange nicht vollständig, und hier, bei Colostrum, wird wahrscheinlich sowohl die grosse Salzmenge wie die grosse Säuremenge bewirken, dass die Ausfällung sehr unvollständig wird.

2. Colostrum 1^{ster} Melkung. 29./3. 1887.

2,123 gr. Milch enthielten 0,0532 gr., d: 2,506% Total-Stickstoff.

Beim Fällen von 3,260 gr. Milch mit Gerbsäure wurden im Niederschlage 0,07406 gr. N, d: 2,269% Eiweiss-Stickstoff erhalten.

Zur Bestimmung des Kaseins mit Essigsäure wurden 10,070 gr. Milch verwendet, welche in der Fällung 0,05642 gr. N, d: 0,56% Kasein-Stickstoff gaben.

Die gesammelte Menge von Kasein- und Globulin-Stickstoff wurde aus 5,272 gr. Milch mit Magnesiumsulfat ausgefällt und machte 0,1064 gr. N, 2,02% aus.

Man erhält also hier als Maximalwerth $2,02 \div 0,56 = 1,46\%$ Globulin-Stickstoff.

Das Filtrat von der Fällung mit Magnesiumsulfat wurde mit Gerbsäure gefällt, und hierbei 0,01330 gr. N, d: 0,252% Albumin-Stickstoff erhalten.

Ein Minimalwerth für das Globulin im selben Colostrum wurde gefunden beim Sättigen von 5,917 gr. Milch, die mit zwei Volumen Kochsalzlösung verdünnt war, mit Kochsalz in Substanz. Das Filtrat hiervon gab bei der Fällung mit Magnesiumsulfat 0,01470 gr. N, d: 0,248% Globulin-Stickstoff.

Das Filtrat hiervon wurde, nach Verdünnen mit Wasser, mit Phosphorwolframsäure gefällt, wobei 0,01470 gr. N, d: 0,248% Albumin-Stickstoff, mit der vorigen Albuminbestimmung übereinstimmend, gefunden wurde.

Obgleich die Grenzen für die Menge des Globulin-Stickstoffes freilich sehr bedeutend sind, so zeigen sie doch, dass das Globulin hier im Colostrum in weit grösserer Menge vorhanden ist, als man bisher geglaubt hat; selbst die niedere Grenze würde einem Globulingehalte von 1,58% (α : Stickstoff $\times 6,37$) entsprechen. Dass ausserdem die Kochsalzfällung wirklich eine bedeutende Menge Globulin enthält, und nicht gänzlich aus Kasein besteht, erwies sich dadurch, dass, nach Auspressen der meisten Salzlauge aus dem mit Salzlösung ausgewaschenen Niederschlage zwischen Filtrirpapier, die Lösung desselben in Wasser, nach Abfiltriren von ungelöstem Fett, beim Erhitzen eine starke Coagulation von Globulin gab. Wie im vorigen Abschnitte gesagt, kann die Lösung einer ausgewaschenen Kochsalzfällung aus gewöhnlicher Milch kein solches Verhalten zeigen. Das Filtriren der Lösung der Kochsalzfällung in Wasser geht leider nur sehr langsam vor sich, und wahrscheinlich wird es gar nicht gelingen, die ganze Lösung zu filtriren, denn das Kasein scheint hier in derselben halb aufgequollenen Form vorzukommen, wie es in der Milch vorhanden ist, so dass es leicht auf dem Filtrum zurückbleibt. Man darf deshalb auch nicht auf eine quantitative Bestimmung des Globulins durch Coagulation der genannten Lösung hoffen, welches sonst nahe zur Hand gelegen hätte.

Um indessen einen Versuch zu machen und mir daraus einen ungefähren Begriff von der in der Kochsalzfällung vorhandenen coagulablen Eiweissmenge zu machen, wurde in dem folgenden Versuche die Kochsalzfällung in Wasser gelöst und zu 120 cbem. aufgefüllt, wonach 60 cbem. von dem Filtrate durch Erhitzen (natürlich ohne Säurezusatz!) coagulirt wurden. Das Coagulum, welches sich klar und gut absetzte, wurde abfiltrirt und nach Auswaschen zur Stickstoffbestimmung benutzt.

3. Colostrum 2^{ter} Melkung. 5./5. 1887.

Total-Stickstoff: 2,091 gr. Milch gaben 0,0518 gr. N, α : 2,566%.

4,039 gr. Milch gaben in dem Niederschlag mit Gerbsäure 0,0994 gr. N, α : 2,461% Eiweiss-Stickstoff, wonach das Filtrat noch 0,00350 gr. N, α : 0,086% Stickstoff enthielt. Die Summe macht 2,547% aus.

Im Kasein-Niederschlage mit Essigsäure zeigten 5,035 gr. Milch 0,02744 gr. N, α : **0,534%** Kasein-Stickstoff.

Aus 5,576 gr. Milch wurde die gesammte Kasein- und Globulinmenge durch Magnesiumsulfat gefällt, und hierin 0,11970 gr. N, α : **2,147%** Stickstoff gefunden.

Die Differenz zwischen dieser und der vorigen Bestimmung ergibt **1,613%** Globulin-Stickstoff als Maximalwerth.

Die Albuminmenge wurde in diesem Falle nicht besonders bestimmt, sondern aus den übrigen Ziffern zu **0,314%** Albumin-Stickstoff berechnet.

Beim Sättigen von 5,448 gr. Milch mit Kochsalz in Substanz in gewöhnlicher Weise, und Fällen des Filtrates hiervon mit Magnesiumsulfat, wurden im letzteren Niederschlage 0,01092 gr. N, α : **0,200%** Globulin-Stickstoff als Minimalwerth erhalten.

Auch der Kochsalz-Niederschlag wurde in oben beschriebener Weise untersucht, und die darin enthaltene coagulable Eiweissmenge durch 0,03822 gr. N in dem halben Filtrate bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass die Zusammensetzung des Filtrats in dieser Hinsicht ganz hindurch homogen ist, bekömmt man also im Ganzen 0,07644 gr., α : **1,404%** Globulin-Stickstoff.

Merkwürdiger Weise stimmt die Summe von den Stickstoffmengen dieser beiden Globulinfällungen ($1,404 + 0,200 = 1,604\%$) so gut wie vollständig mit dem oben als Differenz bestimmten Maximalwerth (1,613%). Doch wage ich nicht, dies anders als eine Zufälligkeit zu betrachten, denn namentlich die Operationen mit der Kochsalzfällung sind nicht von der Art, dass sie sich für eine genaue quantitative Methode eignen.

4. Colostrum 1^{ster} Melkung. 22./5. 1887.

2,060 gr. enthielten 0,04578 gr. N, α : **2,222%** Total-Stickstoff.

Aus 5,223 gr. Milch wurde das Kasein mit Essigsäure gefällt; es wurden in der Fällung 0,03752 gr. N, α : **0,718%** Kasein-Stickstoff erhalten.

5,105 gr. Milch gaben im Niederschlage mit Magnesiumsulfat 0,09716 gr. N, α : **1,903%** Kasein- und Globulin-Stickstoff. Also als Differenz **1,185%** Globulin-Stickstoff.

Aus dem Filtrate von der Magnesiumsulfatfällung schlug Gerbsäurelösung 0,00934 gr. N nieder, α : **0,183%** Albumin-Stickstoff.

5,281 gr. Milch wurden mit Kochsalz gefällt. Diese Fällung zeigte, nach Lösen in Wasser und Filtriren von ungelöstem Fett, beim

Erhitzen eine reichliche Coagulation, deren Grösse doch nicht quantitativ bestimmt wurde. Das Filtrat von der Kochsalzfällung wurde darauf mit Magnesiumsulfat gefällt, und in diesem Niederschlage wurden 0,01582 gr. N, d: **0,300%** Globulin-Stickstoff als Minimumwerth gefunden. Aus dem Filtrate hiervon schied Gerbsäure 0,00966 gr. N, oder **0,183%** Albumin-Stickstoff aus. Die letztere Bestimmung stimmt vollständig mit der vorigen Albuminbestimmung überein.

In dem Filtrate von der Gerbsäurelösung von 5,082 gr. Colostrum fanden sich noch 0,00381 gr. oder **0,076%** nicht-eiweissartiger Stickstoff.

Man hat also:

| | |
|---|--|
| Total-Stickstoff | = 2,222% |
| Nicht-Eiweiss-Stickstoff | = 0,076 » |
| | <hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> 2,146% |
| Kasein- und Globulin-Stickstoff | = 1,903% |
| Albumin-Stickstoff | = 0,183 » |
| | <hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> 2,086% |

Es ist also im Ganzen ein Fehler von **0,06%** Stickstoff auf die vier Analysen zu vertheilen.

5. Colostrum 1^{ster} Melkung. 10./9. 1887.

2,660 gr. Milch enthielten 0,02912 gr. N, d: **1,10%** Total-Stickstoff.

Der gesammte Kasein- und Globulin-Stickstoff wurde in 3,284 gr. Milch durch Fällen mit Magnesiumsulfat bestimmt, und es wurden hierbei 0,02352 gr. N, d: **0,716%** solcher Stickstoff gefunden.

Ausserdem wurde aus 5,184 gr. Milch mittelst Essigsäure das Kasein niedergeschlagen und hierin 0,02856 gr. N, d: **0,55%** Kasein-Stickstoff gefunden. Für den Globulin-Stickstoff ergibt sich also im Maximum **0,166%** N.

Die niedere Grenze des Globulin-Stickstoffes wurde erhalten durch Fällen von 5,200 gr. Milch mit Kochsalz und darauf folgende Sättigung des Filtrates mit Magnesiumsulfat. Die letztere Fällung enthielt 0,0042 gr. N, d: **0,081%** Globulin-Stickstoff.

Die in beschriebener Weise untersuchten Proben von Colostralmilch stammten von Kühen des hiesigen landwirthschaftlichen Institutes, zum grössten Theile Ayrshire Rasse; jedoch nicht rein, aber mehr oder weniger mit Blut schwedischer Gebirgsrasse, sogenannter Landrasse, und Shorthorn gekreuzt.

Die analytischen Resultate sind in der nachfolgenden Uebersicht tabellarisch zusammengestellt.

| | I. Total- Stickstoff. | II. Eiweiss- Stickstoff. | III. Mit Mg SO ₄ fällbarer Stickstoff. | IV. Kasein- Stickstoff (approx.). | V. Globulin- Stickstoff (approx.). | VI. Albumin- Stickstoff. | VII. Nicht- eiweiss- artiger Stickstoff. |
|----|-----------------------------|--------------------------------|--|--|---|--------------------------------|--|
| 1. | 1,232 | 1,025 ¹⁾ | 0,887 | — | 0,100 | 0,138 | 0,207 ²⁾ |
| 2. | 2,506 | 2,269 | 2,02 | 0,56 | { 0,248 1,46 } | 0,250 | 0,237 ²⁾ |
| 3. | 2,566 | 2,461 | 2,147 | 0,534 | { 1,604 1,613 } | 0,314 ³⁾ | 0,086 |
| 4. | 2,222 | 2,086 ¹⁾ | 1,903 | 0,718 | { 0,300 1,185 } | 0,183 | 0,076 |
| 5. | 1,10 | — | 0,716 | 0,55 | { 0,081 0,166 } | — | — |

Es geht aus dieser Uebersicht hervor, dass die Zusammensetzung des Colostrums mit Hinsicht auf die Eiweisskörper grossen Schwankungen unterworfen ist. Die Kaseinmenge war stets etwas grösser als in normaler Milch. Die Albuminmenge variirte zwischen Werthen, welche nur etwas über dem Normalen lagen (1), bis ca. das Dreifache hiervon, erreichte aber nie so colossale Werthe wie bei Eugling's Untersuchungen⁴⁾. Man sieht weiter, dass das Globulin in allen untersuchten Fällen als ein wesentlicher Bestandtheil hervortritt, und obgleich bis jetzt noch keine absolut genaue Bestimmung dieses Körpers möglich war, so ist es doch im höchsten Grade wahrscheinlich gemacht, dass es wenigstens in ebenso grosser Menge wie das Laktalbumin auftritt, und dass es wahrscheinlicher Weise in gleich grossem Grade auf dem Vorkommen dieser beiden Eiweisskörper in einigermaßen grosser Menge beruht, dass das Colostrum im Gegensatz zu gewöhnlicher Milch in der Wärme coagulirt und hierdurch eine in Schweden, Nor-

1) Aus III und VI berechnet.

2) Als Differenz von I und II berechnet.

3) Aus II und III berechnet.

4) Hiermit ist natürlich nicht gemeint, zu bestreiten, dass solche Werthe vorkommen können.

wegen und Finland allgemein genossene Speise («Kalb-Käse» genannt) liefert.

Aus der obigen Tabelle geht auch hervor, dass die Menge der nicht-eiweissartigen Bestandtheile der Colostralmilch deutlich grösser ist als wie in normaler Milch üblich (0,04—0,05% N). Wenn auch die hohen berechneten Ziffern der Beispiele 1—2 vielleicht auf einem Zusammenhäufen der Fehler der einzelnen Stickstoffbestimmungen beruhen können, so liefert doch andererseits die gegenseitige Uebereinstimmung, welche wir oft zwischen berechnetem und gefundenem Stickstoffgehalte gefunden haben, eine Art Garantie, dass diese Fehler keinen so besonders grossen Einfluss haben können; auch weisen die Werthe der Beispiele 3 und 4, die direct bestimmt wurden, in derselben Richtung.

Die obigen Studien wurden in 1885 mit Unterstützung öffentlicher dänischer Mittel im Laboratorium des Herrn Prof. O. Hammarsten in Upsala begonnen; die Methoden und Resultate wurden aber seitdem im chemischen Laboratorium des hiesigen höheren milchwirtschaftlichen Institutes theils neu geprüft, theils gänzlich umgearbeitet.

Milchwirtschaftliches Institut Ultuna pr. Upsala.