

Ueber die fractionirte Krystallisation des Eieralbumins.

Von

St. Bondzynski und L. Zoja.

(Aus dem Laboratorium von Professor Bunge in Basel.)
(Der Redaction zugegangen am 16. December 1893.)

Der Eiweissstoff des Hühnereies war seit einer Reihe von Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Es fehlt auch nicht an Bemühungen, ihn von fremden Stoffen zu befreien und in reinem Zustande zu analysiren. Würtz hat zu diesem Zwecke die Fällung mit Bleiessig benützt, Starke mit Natriumsulfat, Hofmeister mit Ammoniumsulfat. Alle diese Fällungen geben Niederschläge, welche nach Entfernung des Fällungsmittels ein in Wasser lösliches Eiweiss liefern. Es ist also nicht anzunehmen, dass bei diesem Verfahren ein tieferes Eingreifen in das Molekül des Eiweissstoffes stattfinden konnte. Wenn wir aber die Zusammensetzung dieser Präparate, sowie jener von Dumas und Cahours, Lieberkühn, Harnack und Schützenberger¹⁾ nach anderen Methoden erhaltenen, mit einander vergleichen, so finden wir in dieser Reihe Kohlenstoffzahlen, welche zwischen

¹⁾ Schützenberger's Eiweiss wurde einfach durch Coagulation und Entfetten des Coagulums erhalten.

52,25 und 54,0%¹⁾, Stickstoffzahlen, welche zwischen 15,0% und 16,6%, und einen Schwefelgehalt, welcher zwischen 1,0% und 1,99% sich bewegt, also Schwankungen, welche nicht gern auf analytische Fehler zurückgeführt werden, so dass man unwillkürlich die Anwesenheit mehrerer Eiweissstoffe von verschiedener Zusammensetzung vermuthet. Obgleich den genannten Forschern — Hammarsten²⁾, Hofmeister und Harnack ausgenommen — zur Analyse ein Gemisch von Albumin und Globulin vorlag und uns die Kenntniss der Zusammensetzung des Eierglobulins fehlt, so musste man doch bei dem nicht hohen Globulingehalt des Eiereiweisses in erster Linie an die Möglichkeit verschiedener Albumine denken.

Wir haben uns zur Aufgabe gestellt, zur Lösung dieser Frage die Krystallisationsversuche von Hofmeister³⁾ herbeizuziehen. Daneben wollten wir diese Methode auf ihre Anwendbarkeit und Ausdehnung prüfen mit dem Bewusstsein, dass die Möglichkeit der Beschaffung grösserer Menge eines durch Krystallisation individualisirten Eiweisskörpers einen grossen Fortschritt in der Erforschung der chemischen Natur der Eiweissstoffe bedeutet. Dies ist auch zugleich der Grund, dass wir es nicht für überflüssig halten, diesen Theil unserer Arbeit, welcher sich auf die Darstellung der zu analysirenden Präparate bezieht, etwas ausführlicher zu beschreiben.

8000 chem. Eiereiweiss, welches aus frischen Hühnereiern unter sorgfältiger Trennung vom Eigelb erhalten wurde, wurden gut geschlagen und die vom Schaum getrennte Flüssigkeit mit dem gleichen Volum einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt; von ausgefälltem Globulin wurde filtrirt, das Filtrat, welches ziemlich intensiv fleischroth gefärbt war, wurde in nicht allzu dünner Schicht in Krystallisationschalen der Verdunstung ausgesetzt. Schon nach wenigen

¹⁾ Den Kohlenstoffgehalt 54,0% hat Brittner gefunden, s. Beilstein's Handbuch der Org. Ch., 2. Aufl., Bd. 3, S. 1264.

²⁾ S. die Arbeit von Starke: «Beiträge zur Kenntniss des Serum- und Eieralbumins», Jahr. über die F. d. Th., Bd. 11 (1881).

³⁾ Hofmeister: Ueber krystallisirtes Eieralbumin, Diese Zeitschr., Bd. 14, S. 165, und Bd. 16, S. 187.

Tagen begann die Trübung. Nach 13 Tagen waren der Boden und die Wand des Gefässes mit einer reichlichen Ausscheidung bedeckt, welche wie aus delicates weichen Warzen bestehend an der Gefässwand haftete, sowie die Oberfläche der Flüssigkeit bedeckte. Die mikroskopische Untersuchung ergab Sphären von verschiedener Grösse, an welchen keine krystallinische Structur zu erkennen war. Es wurde mit Hülfe der Saugpumpe filtrirt. Das Filtrat war eine gelbe Flüssigkeit, der Niederschlag stellte einen festen Kuchen von rosarother oder fleischrother Farbe dar, welcher etwa 80 gr. wog.

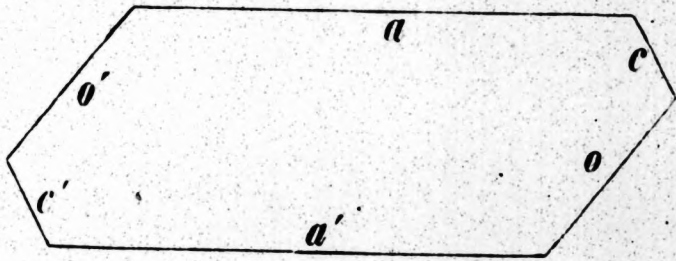
Er wurde in eine $\frac{1}{2}$ gesättigte Ammoniumsulfatlösung gebracht. Ein Theil löste sich darin und lieferte eine röthliche Flüssigkeit, während ein anderer als unlöslicher, weisser Rückstand zurückblieb. Dieser wurde in Wasser gelöst und mit der gesättigten Ammoniumsulfatlösung so lange versetzt, bis eine deutliche Trübung entstand. Von beiden Lösungen wurden klare Filtrate erhalten, welche wieder der freien Verdunstung überlassen wurden. Um dem Leser das Verfolgen der Einzelheiten zu erleichtern, wollen wir diesen Versuch mit A bezeichnen, den in $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung löslichen Theil mit A₁, den anderen in Wasser gelösten A₂, und die beim Umkrystallisiren erhaltenen Fractionen der Reihe nach mit Nummern versehen. Nach einigen Tagen wurde in der Lösung A₂ eine reichliche Ausscheidung beobachtet, welche bei mikroskopischer Untersuchung neben den früher beobachteten Kugeln zahlreiche tyrosinähnliche Sphären von nadelförmigen Krystallen aufwies.

Der Niederschlag wurde von der Mutterlauge auf einem Filter mit der Saugpumpe getrennt (er wog etwa 30 gr.), in Wasser (etwa 120 chem.) gelöst, mit der gesättigten Ammoniumsulfatlösung bis zur constanten Trübung versetzt, die Trübung mit einigen Tropfen Wasser zum Verschwinden gebracht und das klare Filtrat (A₂) in der Krystallisationsschale stehen gelassen. Nach 4 Tagen gab es eine Ausscheidung, welche aus lauter vereinzelt oder zu Drusen vereinigt Krystallen bestand. Das Bild zeigte eine so homogene Krystallmasse, dass dieselbe zur Analyse bestimmt wurde.

Das nach dem Schütteln mit $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung erhaltene Filtrat Ab_1 gab bald einen nicht geringen Bodensatz; derselbe war röthlich gefärbt, enthielt aber ebenfalls neben den Kugeln zahlreiche nadelförmige Krystalle. Die Ausscheidung wurde filtrirt und noch einmal mit $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung geschüttelt, wobei Alles bis auf einen sehr geringen Rückstand gelöst wurde. Das fast vollständig farblose Filtrat (Ab_2) gab nach 6 Tagen eine Ausscheidung, welche eine homogene weisse Krystallmasse war. Das Präparat (Ab_2) wurde ebenfalls zur Analyse aufgehoben.

Ein anderer Versuch wurde mit Eiweiss aus 200 frischen Eiern angestellt. Das Arbeitsverfahren war das gleiche. Die erste aus Eiweisskugeln bestehende Ausscheidung wurde nach 14 Tagen filtrirt. Das Filtrat (Bf_1), eine hellgelbe Flüssigkeit, wurde einer weiteren Verdunstung überlassen. Der auf dem Filter zurückgebliebene röthliche Niederschlag wurde in Wasser gelöst (1100 ccm.) und mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zur geringen Trübung versetzt (900 ccm.). Die filtrirte röthliche Lösung (Ba_1) wurde stehen gelassen. Nach 10 Tagen wurde die Flüssigkeit, welche aus einem dicken Brei von Eiweisskugeln und Eiweisskrystallen bestand, zu festen Kuchen abgesaugt. Die feuchte Masse wog 1500 gr. Sie wurde in 2700 ccm. der $\frac{1}{2}$ gesättigten Ammoniumsulfatlösung durch Umrühren gut vertheilt, 24 Stunden darin zurückgelassen, abgesaugt und noch einmal in derselben Weise mit 1500 ccm. $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Schon beim ersten Auswaschen wurde ein allmähliches Schwinden der Kugeln bemerkt. Nach dem zweiten bestand der in der Lösung suspendirte, darin unlösliche Niederschlag ausschliesslich aus gut ausgebildeten, den Hämoglobinkrystallen (aus Pferdeblut) ähnlichen Säulen, während die Sphären vollständig gelöst worden waren. Nach dem Absaugen wog der unlösliche Krystallbrei 350 gr. Er wurde in Wasser gelöst (1500 ccm.) und allmählich unter Umrühren die gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zu beginnender constanter Trübung hinzugefügt (1000 ccm.). Nach 2 Tagen stellte die Lösung einen Brei von Krystallen dar.

Herr Dr. E. Artini, Docent in Pavia, welcher auf unsere Bitte hin die krystallographische Untersuchung der Krystalle gütigst übernommen hat, beschreibt sie folgendermassen:



« Es sind Täfelchen, deren Flächen höchstens 6 Seiten besitzen. Die Seiten C und C' fehlen manchmal. Die Messung der Supplementzirkel ergab:

$$\text{für } a \wedge c = 71^{\circ},$$

$$\text{» } c \wedge o = 67^{\circ},$$

$$\text{» } o \wedge a' = 42^{\circ}.$$

Im polarisirten Lichte, bei gekreuzten Nicols untersucht, zeigen sie keine merkliche Doppelbrechung. Es ist anzunehmen, dass es sich um Krystalle des monoklinischen oder triklinischen Systems handelt».

Da diese Krystalle mit denen aus Harn von Byrom-Bramwell und Noël Paton¹⁾ erhaltenen Globulinkrystallen auffallende Aehnlichkeit zeigten und die Schwerlöslichkeit derselben in $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung an etwa zurückgebliebenes Globulin denken liess, so wurden diese, sowie alle anderen in Ammoniumsulfat schwer löslichen Fractionen auf Globulin untersucht, es wurde aber weder beim Verdünnen mit Wasser und Durchleiten von Kohlensäure, noch bei Dialyse ein Globulinniederschlag bemerkt. Die Krystalle wurden zur Analyse aufbewahrt. Das Filtrat von der ersten Ausscheidung, die gelbe Mutterlauge Bf, gab nach 4 wöchentlichem Stehen eine bedeutende Menge eines aus Sphären bestehenden Präcipitats; dasselbe wurde in eine $\frac{1}{2}$ gesättigte Ammoniumsulfatlösung gebracht, worin es leicht und vollständig gelöst wurde. Die Lösung (Bf₂) wurde der Verdunstung überlassen. Es

¹⁾ Reports from the Laboratory of the Royal College of Physicians Edinburgh, Vol. IV (1892), S. 47.

wurde nach Verfluss eines Monats eine Ausscheidung erzielt, welche bei mikroskopischer Betrachtung durch und durch aus feinen Nadelchen bestehend sich erwies. Die vollkommen weissen Krystalle wurden von der Mutterlauge abgesaugt, mit $\frac{2}{3}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung nachgespült und lieferten uns auch ein Präparat zur Analyse (Bf_2). Mit dem Präcipitat aus der Lösung Bf_1 war wohl alles Eiweiss auskrystallisirt. Die Mutterlauge davon gab beim Kochen nur eine unbedeutende Trübung, wohl aber beim Sättigen mit Ammoniumsulfat einen reichlichen, offenbar aus Hemialbumose bestehenden Niederschlag. Ob Hemialbumose im Eiereiweiss vorgebildet vorhanden ist oder während der längeren Dauer der Krystallisation entstanden, wollen wir nicht entscheiden. Der Befund müsste an besonders zuverlässig frischem Material wiederholt werden, wir erfahren aber nachträglich, dass vor Kurzem Salkowski¹⁾ Hemialbumose im Eiereiweiss gefunden hat.

Es sei noch ein dritter Versuch erwähnt, bei welchem gleichfalls mit einer grossen Eiweissmenge (2700 cbem.) gearbeitet wurde. Nach 14 Tagen wurde ein röthlich gefärbter Niederschlag von der gelben Mutterlauge getrennt. Mit der zu festen Kuchen abgesaugten Eiweissmasse konnte ein Becherglas von 500 cbem. bis zum Rande gefüllt werden. Bei der weiteren Behandlung wurden Präparate erhalten, welche neben Eiweisskrystallen Eiweisskugeln aufwiesen, da wir aber verhindert waren, die Krystallisation weiter zu verfolgen, gelangte keine von den Fractionen zur Analyse. Die gelbe Mutterlauge gab nach 4 Wochen eine neue Ausscheidung und ein gelbes, fast eiweissfreies, aber hemialbumosehaltiges Filtrat. Das Resultat dieses Versuches ist also die Bestätigung des früher Beobachteten.

Bei der Ausführung unseres Versuchsplanes haben wir uns die Erfahrung von Hofmeister, sowie von Gabriel¹⁾, welcher die Versuche von Hofmeister wiederholt hat, zu

¹⁾ Centralbl. f. medic. Wissenschaften, Jahrg. 1893, Nr. 30.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 15: «Ueber die Eiweisskrystalle von Hofmeister».

Nutzen gemacht. Die von uns beobachteten Erscheinungen stimmen auch mit der Beschreibung unserer Vorgänger überein.

Die Kugeln wurden immer als Vorläufer der Krystalle beobachtet. Die Entwicklung des Vorganges kann man in allen Stadien zu Gesicht bekommen. Neben den kleinen Tröpfchen oder Körnchen sieht man Eiweisskugeln von verschiedenen Dimensionen. Die Eiweisskugeln, wenn sie eine gewisse Grösse erreicht haben, zuweilen schon bei der ersten Ausscheidung, häufiger nach einmaligem Auflösen, haben die Neigung, trüb zu werden, was besonders leicht zu bemerken ist, wenn das Objectiv des Mikroskopes unvorsichtig auf das Deckgläschen drückt. Grob mechanische Momente (Schütteln, Stossen) können sogar die Krystallisation zu Stande bringen. Als wir eine Probe eines Präparates, welches nur Eiweisskugeln enthielt, einem liebenswürdigen Bekannten nach Bern zur photographischen Aufnahme geschickt hatten, wurde dieselbe am dritten Tag in Bern zum grössten Theil aus Krystallen bestehend gefunden. Die strahlig schattirten Kugeln sind die directen Vorgänger der tyrosinähnlichen Sphäroide von Nadeln, welche weiter auch zu einzelnen Krystallen zerfallen. Also ein Bild, welches genau der Beschreibung von Hofmeister und Gabriel entspricht. Die mehrfache Behandlung mit Ammoniumsulfat, Auflösen und Verdunstenlassen befördert entschieden die Krystallisation. In der ersten Ausscheidung haben wir niemals Krystalle beobachtet. Ob dabei die Reinheit des Präparates eine Rolle spielt, bleibt dahingestellt. Wir sind geneigt, zu glauben, dass durch die wiederholte Behandlung mit Ammoniumsulfat eine krystallisationsfähige Anordnung der Moleküle stattfindet. Ob dieses auf einer Depolymerisation, wie es Gabriel haben will, oder etwa auf einer Anlagerung des Krystallwassers beruht, wollen wir nicht entscheiden. Es ist bemerkenswerth, dass die ammoniumsulfathaltigen Eiweisslösungen sich durch leichte Filtrirbarkeit auszeichnen; die Mutterlaugen unserer krystallinischen Präparate, sowie die wässerigen Lösungen der Krystalle liessen sich sehr rasch und klar filtriren. Es machte den Eindruck, als ob ein Stoff seine colloidalen Eigenschaften eingebüsst hat.

Höchstes Interesse in dieser Beziehung erregt aber die Beobachtung von Byrom-Bramwell und Noël Paton¹⁾, welche eine ungewöhnliche, ja erstaunliche Menge Eiweiss (7,5 gr. pr. 100 ccm. Harn) in den Harn übergehen und direct aus dem Harn krystallisiren sahen. Es wäre denkbar, dass das Eiweiss schon im Blute seine colloidalen Eigenschaften eingebüsst hatte und dadurch leichter durch die Nierenkapillaren diffundiren konnte. Ob in diesem Fall der Salzgehalt²⁾ des Blutes und des Harnes ein abnorm hoher war, konnte nicht untersucht werden.

Die von uns zur Analyse dargestellten krystallinischen Präparate sind Fractionen von verschiedenem Löslichkeitsvermögen gegenüber einer Ammoniumsulfatlösung. Die Präparate Aa₂ und Ba₂ sind die schwer löslichen, Ab₂ und Bf₂ die leicht löslichen Fractionen. Davon verdienen Ba₂ und Bf₂ besondere Beachtung, da sie in Bezug auf die Löslichkeit in $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung die am weitesten von einander entfernten Fractionen³⁾ darstellen.

Behufs Vorbereitung zur Analyse wurden die Krystalle von der Mutterlauge zu festen Kuchen abgesaugt, in Wasser gelöst, mit der 2—3fachen Menge 95 proc. Alkohol gefällt, nach 24 Stunden die Flüssigkeit sammt dem Coagulum in mehrere Liter Wasser gegossen und so lange mit Wasser ausgewaschen, bis wir die Sicherheit gewonnen hatten, dass keine Spur Ammoniumsulfat am Eiweisscoagulum haften konnte. Zu dem Zwecke wurde nach jeder Filtration der Niederschlag vom Trichter⁴⁾ in einen grossen Porzellanmörser gebracht und mit

¹⁾ Früher citirte Arbeit.

²⁾ Aber auch Harnstoff, sowie harnsaures Natrium scheinen die Fähigkeit zu haben, diesen Process zu beeinflussen; Löwit hat sich des Harnstoffzusatzes bedient, um seine Globulinplättchen darzustellen. Löwit: Beiträge zur Lehre von der Blutgerinnung, Sitzungsber. d. Wien. Acad. d. Wiss., Bd. 90 (1884), S. 115.

³⁾ Zur etwaigen Orientirung über das Verhältniss dieser Fractionen zu einander mag erinnert werden, dass zum Versuch B 5 Liter Eiweiss verwendet wurden und dass die Fraction Ba₁ — 62 gr., die Fraction Bf₂ — 14 gr. reines Eiweiss lieferte.

⁴⁾ Statt Filtrirpapier wurden rund geschnittene Stückchen von feinem weissen seidenen Tuch benutzt.

geringer Wassermenge zu feinen Flocken zerrieben. Das Auswaschen wurde trotz dem Verschwinden der Schwefelsäurereaction im Filtrate noch einige Zeit fortgesetzt. Die Präparate waren schliesslich vollkommen schwefelsäurefrei¹⁾. Das Wasser wurde dann mit Alkohol verdrängt und darauf mit Aether nachgespült²⁾.

Im lufttrockenen Zustande liess sich das grobkörnige Coagulum zu feinem schneeweissem Pulver leicht verreiben. Dieses wurde im Trockenkasten zwischen 107° und 110° C. so lange getrocknet, bis die zweite 5 Stunden nach der ersten erfolgte Wägung keine grössere Gewichtsabnahme als etwa 0,5 mgr. ergab. Dies erforderte zuweilen ein bis 80 Stunden dauerndes Trocknen (bei Anwendung von 5—6 gr. Substanz).

Die Analyse ergab folgende Mittelwerthe:

	Fraction Aa ₂ .	Fraction Ba ₂ .	Fraction Ab ₂ .	Fraction Bf ₂ .
C	52,44 %	52,33 %	52,39 %	52,07 %
H	7,26 »	7,13 »	6,95 »	6,98 »
N	15,58 »	15,47 »	15,11 »	15,29 »
S	—	1,614 »	1,700 »	1,693 »
O	—	23,48 »	23,85 »	23,97 »

Die früheren Forscher fanden bei der Analyse des Eieralbumins Folgendes:

	Hammarsten ³⁾ (Präparat von Starke).	Ham- marsten ⁴⁾	Harnack ⁵⁾ .	Harnack ⁶⁾ .	Löw ⁷⁾ .	Hof- meister ⁸⁾ .
C. . .	52,25 %	—	53,01	—	—	53,28
H . .	6,90 »	—	6,98	—	—	7,26
N . .	15,25 »	—	15,76	—	—	15,00
S. . .	1,93 »	1,67	1,39	1,91	1,7—1,8	1,09
O . .	23,67 »	—	22,86	—	—	23,37

¹⁾ Eine Probe wurde in Soda gelöst, mit Essigsäure angesäuert und das Filtrat auf Schwefelsäure geprüft.

²⁾ Alkohol und Aether wurden zu diesem Versuche von uns selbst rectificirt, um die schwer flüchtigen Bestandtheile der Handelspräparate vollkommen zu entfernen.

³⁾ Oben citirte Arbeit.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 9.

⁵⁾ Ebendasselbst, Bd. 5.

⁶⁾ Ber. d. deutsch. Ch. Ges., Bd. 23 (1890), S. 90.

⁷⁾ Jahresber. über die Fortschritte d. Chemie, 1883, S. 1383.

⁸⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 16.

Bei der Betrachtung unserer analytischen Resultate ergibt sich eine kleine Differenz im Stickstoffgehalte der schwerlöslichen und der leichtlöslichen Fractionen. Ferner wurde in beiden leicht löslichen Fractionen (Ab_2 und Bf_2) um ein geringes (0,08%) mehr Schwefel gefunden als in der schwerlöslichen Fraction Ba_3 , während die Kohlenstoffzahlen eine nahe Uebereinstimmung aufwiesen. Die beobachteten Differenzen liegen aber ziemlich innerhalb der zulässigen Fehlerschwankungen und gestatten nicht, einen Unterschied in der chemischen Zusammensetzung der einzelnen Fractionen zu befürworten. Die grossen Differenzen zwischen den früheren Analysen des Eiereiweisses bleiben unerklärt. Es ist nicht anzunehmen, dass die Resultate älterer Analysen durch den Globulingehalt der Präparate beeinflusst wurden, denn nach Dillner¹⁾ beträgt die Globulinmenge im Eiereiweiss nur 6,6% der gesammten Eiweissmasse. Die von uns erhaltenen Zahlen stehen denen von Hammarsten sehr nahe, differiren aber stark von der Analyse des Präparates aus Eiweisskrystallen von Hofmeister.

In der Hoffnung, dass die bestehende Verschiedenheit der Löslichkeit in sonstigen Eigenschaften ihren Ausdruck findet, haben wir die Bestimmung der Coagulationspunkte und die polarimetrische Untersuchung einzelner Präparate unternommen. Ausser den Grenzfractionen der Eiweissportion B haben wir noch zwei ihrer Löslichkeit nach dazwischen stehende, durch und durch krystallinische Fractionen in Untersuchung gezogen. Die Fraction Bm stellt die Ausscheidung aus der Mutterlauge von den Krystallen Ba_2 dar. Die Fraction Bb_2 wurde von der Lösung geliefert, welche durch Behandeln der Ausscheidung Ba_1 mit $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung erhalten worden war.

Die Versuche haben wir mit der wässerigen Lösung der ammoniumsulfathaltigen Krystalle ausgeführt. Dieselben zeigten immer neutrale Reaction. Die Eiweissmenge wurde in den Lösungen durch Coagulation bestimmt, ausserdem aus einer

¹⁾ Jahresber. über die Fortschr. d. Thierch., Bd. 15.

Schwefelsäurebestimmung der Ammoniumsulfatgehalt berechnet. Die polarimetrische Untersuchung wurde mit einem Wildschen Apparate ausgeführt und stellt Mittelzahlen dar aus je 20 von zwei Beobachtern gelieferten Ablesungen. Zur Bestimmung des Coagulationspunktes wurden 15 ebem.-haltige Reagensgläser aus dünnem Glas angewandt; in dieselben wurden je 10 ebem. der betreffenden Eiweisslösung gebracht und das Reagensglas in ein 1 Liter Wasser enthaltendes Becherglas eingetaucht, wobei für gute Vertheilung der Wärme im äusseren Gefäss, sowie für langsames Steigen der Temperatur gesorgt wurde. Als Coagulationspunkt wurde der Anfangspunkt der Fällung betrachtet.

In der nächstfolgenden Tabelle sind die Fractionen nach ihrer Löslichkeit in der Ammoniumsulfatlösung gereiht, mit Nr. 1 ist die schwerlösliche Fraction bezeichnet.

	Coagulationspunkt.	Eiweissgehalt pro 100 ebem. der Lösung.	Ammonium- sulfat pro 100 ebem.	Specif. Drehung.
Nr. 1: Ba ₂ .	64,5° C.	6,48	1,57	25°8'
	64,5° C.	verdünnt	—	—
	64,5° C.	3,24	0,78	—
Nr. 2: Bm .	—	9,44	2,26	26°2'
Nr. 3: Bb ₂ .	—	11,27	2,73	29°16'
Nr. 4: Bf ₂ .	55,5°—56° C.	8,59	—	34°18'
		3,75	2,00	42°54'

Die Untersuchung ergab also ein allmähliches Steigen der Rotation von den schwerlöslichen zu den leichtlöslichen Fractionen und eine nicht unbedeutende Differenz der Coagulationstemperaturen der Eiweissfractionen. Es sind demnach zwischen den einzelnen krystallinischen Fractionen Unterschiede in physikalischen Eigenschaften vorhanden¹⁾.

¹⁾ Wenn es noch eines Beweises bedürfte, um die gegen die Hofmeister'schen Krystalle von Harnack erhobenen Vorwürfe zu widerlegen, so lässt sich derselbe dieser Tabelle entnehmen, wo aus dem Eiweiss- und Ammoniumsulfatgehalte sich das Mengenverhältniss derselben in den Krystallen leicht ergibt.

Aehnliches wurde früher von A. Gautier¹⁾, sowie Béchamp²⁾ beobachtet. Die betreffenden Publikationen erschienen aber zu der Zeit, wo das Vorhandensein von Globulin im Eiereiweiss noch unbekannt war. Es lässt sich also nicht erkennen, inwiefern die beobachteten Differenzen auf Albumin zurückgeführt werden können. Die vor Kurzem aber erschienene Arbeit von Béchamp³⁾ bringt vielleicht einen Beitrag zur Erklärung der Rotationsunterschiede, ohne dass man zu der Annahme tieferer Unterschiede zwischen den Fractionen genöthigt wäre.

In der Fraction Ba₂, welche uns in grosser Menge analysenrein zur Verfügung stand, wurde noch eine Kalk- und Phosphorsäurebestimmung vorgenommen, was umsomehr nothwendig war, als Hofmeister seine Krystalle als aschefrei bezeichnet.

Wir fanden:

0,285 % / P₂O₅
 0,290 % /
 und 0,261 % Ca O.

Aus der Summe von Kalk und Phosphorsäure ergibt sich ein nicht unbedeutender Kalkphosphatgehalt von 0,55%.

Das in Wasser lösliche unveränderte Eiweiss wurde ja auch von Niemandem aschefrei erhalten. Die früheren diesbezüglichen Angaben von Graham, A. Schmidt und Aronstein wurden später richtiggestellt; die neueren sind unzuverlässig, da eine zu geringe Menge Substanz zur Prüfung gebraucht wurde und der Aschengehalt sicher übersehen oder zu gering gefunden wurde. Andererseits aber ist uns klar, dass man durch solche Eingriffe wie das Auflösen in Kalilauge und Ausfällen mit Säure, wie es Harnack gethan, das Kalkphosphat abspalten kann, und ein in dieser Weise dargestelltes Präparat wird ebenso wie das nach Hammersten dargestellte Casein wohl aschefrei sein. Dieses sowie die Betheiligung

¹⁾ Gautier, Bulletin de la soc. t. XIV, p. 177.

²⁾ Béchamp, Bull. d. la soc. ch. t. XXI.

³⁾ Béchamp, Bull. de la soc. chim. (3) 9 p. 511, referirt in d. Ber. d. d. ch. Ges., Jahrg. 1893, S. 856.

des Kalkphosphates an den Gerinnungserscheinungen des Caseins mit Lab und der Fibringerinnung, sowie ferner eine Reihe aus der Litteratur über das Albumin bekannter Thatsachen, die wir hier nicht näher erörtern können, nöthigen zur Annahme, dass das Eieralbumin vielleicht aber überhaupt das thierische Eiweiss, wenn es Kalkphosphat enthält, an dasselbe chemisch gebunden ist¹⁾. Wie könnte auch anders das alkalische Blut das unlösliche Kalkphosphat den Geweben zuführen.

Versuche mit Eierglobulin.

Die Ammoniumsulfatmethode, welche bei Eieralbumin so gute Dienste leistet, gestattete uns nicht, das Eierglobulin krystallinisch darzustellen.

Die Versuche wurden mit dem durch gesättigte Ammoniumsulfatlösung (1:1) ausgefallten Globulin ausgeführt. Dasselbe wurde mit $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung gelöst. Aus der Lösung wurden leicht Sphären, aber keine Krystalle, erhalten.

Versuche mit Blutserum.

Obgleich in Bezug auf Krystalle gleichfalls nicht von Glück begleitet, aber doch erwähnenswerth, sind unsere Versuche mit Blutserum.

Eine grössere Menge frischen Ochsenblutserums wurde in gleicher Weise wie das Eiereiweiss behandelt. Das gelblich gefärbte globulinfreie Filtrat gab schon nach wenigen Tagen, beim Stehen an der Sonne nach wenigen Stunden, eine Ausscheidung, welche Anfangs aus Körnchen oder kleinen Kugeln bestand und grau gefärbt war, aber nach mehrfachem

¹⁾ In König's Handbuch für Lebensmitteluntersuchung finden wir eine Aschenanalyse der rohen Eiereiweissflüssigkeit. Aus dem in dieser Tabelle gefundenen Kalkphosphatgehalt der Asche und der Trockensubstanzmenge wurde das Kalkphosphat auf trockenes Eiweiss berechnet, und die Berechnung ergab den Werth 0,34%. Das Resultat ist bemerkenswerth, denn es folgt, dass wir den ganzen Kalkphosphatgehalt der rohen Eiweissflüssigkeit in unseren Krystallen wieder gefunden haben (mit einem Plus, welches auf die wenig genaue Ausführung der citirten Analyse zurückzuführen ist).

Auflösen in $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung (worin sie vollständig löslich war) eine vollkommen weisse Fällung gab. Dieselbe bestand nun aus Sphären, welche nach ihrer Gestalt und Grösse nicht von ähnlichen Gebilden aus Eiereiweiss zu unterscheiden waren. Aber selbst nach 4 monatlichem Stehen unter Behinderung der Verdunstung wurden diese Kugeln nicht zu Krystallen umgewandelt.

Das ausgefällte Globulin wurde mit $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung ausgewaschen und in $\frac{1}{3}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung gelöst. Das stark opalescente Filtrat wurde der Verdunstung ausgesetzt. Bereits nach 10 Tagen wurde ein reichlicher Niederschlag erhalten, welcher Anfangs aus feinen Körnchen bestand, leicht aber zu ähnlichen Sphären, wie die oft beobachteten, umgewandelt werden konnte. Wir haben auch versucht, das Globulin durch freie Verdunstung direct aus dem Blutserum, nachdem nur ein sehr geringer Niederschlag zur Entfernung der etwa suspendirten Stoffe (Fett etc.) mit Ammoniumsulfat erzeugt worden, ausfallen zu lassen. Es wurden hier aber ebenfalls nur die feinen Körner sowie Sphären erhalten. Es ist zu bemerken, dass die feinen Granulationen bei Globulin viel häufiger anzutreffen waren und viel schwieriger als beim Albumin zu grösseren Kugeln anwuchsen. Unser negatives Ergebniss schliesst aber nicht die Möglichkeit aus, nach dieser Methode, oder nach dem Princip derselben, Eiweisskrystalle aus Blutserum zu erhalten.

Das Blutserum ist ja eine Flüssigkeit von sehr complicirter Zusammensetzung und wir hatten Gelegenheit, uns zu überzeugen, wie schwer es ist, ein vollkommen reines Eiweisspräparat aus derselben zu isoliren. Zwei- bis dreimal ausgefällte Präparate zeigten noch einen unangenehmen specifischen Geruch und eine grauliche Farbe.

In der Form von Kugeln ausgefälltes Globulineiweiss hat vor mehreren Jahren Drechsel¹⁾ beobachtet, als er in eine Lösung von Serumglobulin in verdünnter Magnesiumsulfatlösung eine concentrirte Magnesiumsulfatlösung dialysirte,

¹⁾ Drechsel: «Eiweisskörper» in Ladenburg's Wörterbuch der Ch., Bd. 3, S. 555.

und die Vermuthung ausgesprochen, dass diese Globulinkugeln krystallinischer Natur seien.

Die Eiweisskugeln, welche am Eiereiweiss als Vorstufen der Krystalle sich erwiesen, stehen wie bekannt nicht als vereinzelte Beobachtung da. Im Pflanzenreiche ist man ihnen oft begegnet und die Darstellung der Eiweisskrystalle aus Pflanzensamen von Schmiedeberg, von Drechsel und seinen Schülern und von Ritthausen deutet darauf hin, dass die Krystalle auch hier im genetischen Zusammenhang mit den Kugeln stehen, unso mehr als diese Krystalle oder sogenannte Krystalloide in den Pflanzen neben den Eiweisskörnern und Eiweisskugeln beobachtet wurden.

Hierher gehören auch die im Eidotter beobachteten Gebilde, welche entweder als Dotterkugeln (in Vogeleiern) vorkommen oder mehr oder weniger gut (bei Fischen, Schildkröten, Batrachien) oft vollkommen (z. B. bei Salamandra atra) ausgebildete Krystalle darstellen¹⁾.

Die am Blutserum beobachteten Erscheinungen erinnern uns an die seiner Zeit lebhaft discutierte Beobachtung von Bizzozero und Hayem, an die Blutplättchen. Löwit²⁾ hat diese Gebilde Globulinplättchen genannt und sie mit seinen künstlich, aus einer Globulin- sowie Fibrinogenlösung durch Einwirkung von Magnesiumsulfat erhaltenen Plättchen verglichen. Die letzten sind wohl unzweifelhaft mit unseren Globulinkugeln aus dem Blutserum identisch.

Albuminkugeln aus einem pathologischen Harn:

Einer von uns³⁾ hatte nachträglich in der medicinischen Klinik in Parma Gelegenheit gehabt, einen eiweissreichen Harn eines Nephritiskranken auf das Verhalten gegen Ammoniumsulfat zu untersuchen und konnte das Albumin ebenfalls in Form der oft erwähnten Sphären erhalten.

¹⁾ «Die Gewebe des menschl. Körpers», von Behrens, Kossel und Schifferdecker, 1889, Bl. 1, S. 266—267.

²⁾ Löwit: «Beiträge zur Lehre von der Blutgerinnung», Sitzungsber. der Wiener Acad. d. Wissensch., Bd. 89, Abth. III, S. 290 und Bd. 90, Abth. III, S. 80, Jahrg. 1884.

³⁾ L. Zoja.

Analytische Methoden und Belege.

Die stark von einander abweichenden Resultate der Analysen von verschiedenen Forschern machen es uns zur Pflicht, das Beifolgende hinzuzufügen.

Zur Kohlenstoffbestimmung haben wir unsere Eiweisspräparate im offenen Rohr, im Platinschiffchen, bei fortwährendem Zufluss von Sauerstoff verbrannt. Der Schwefel wurde durch eine am anderen Ende der Röhre vorgelegte, 10 cm. lange Schicht von Bleichromat zurückgehalten. Die Substanz verbrannte leicht und vollständig unter Zurücklassung feiner Flöckchen schneeweisser Asche.

Die Stickstoffbestimmungen wurden nach der gasometrischen Methode gemacht. Die Substanz wurde fein gepulvert in einer 15 cm. langen Schicht von Kupferoxydpulver oder Bleichromat vertheilt. Die Rolle aus Kupferdrahtnetz war 20 cm. lang. Als Kohlensäureentwickler wurde ein Magnesitrohr benutzt. Der Stickstoff wurde im Zulkowski'schen Apparat aufgefangen. An dem abgelesenen Volum wurde eine dem geringen Luftgehalte entsprechende Correctur vorgenommen, welche sich aus der Verbrennung einer stickstofffreien Substanz (Zucker) ergab.

In den Fractionen Ba₂ und Bf₂ wurden auch Bestimmungen nach Kjeldahl ausgeführt. Die Zersetzung mit Schwefelsäure geschah unter Zusatz von Quecksilber. Die nachträgliche Oxydation mit Permanganat wurde vermieden. Die richtige Handhabung der Methode haben die mit Harnsäure und Hippursäure ausgeführten Controllbestimmungen bestätigt.

Zur Bestimmung des Schwefels wurde das Eiweiss vorher mit Salpetersäure oxydirt, wie im Laboratorium von Bunge seine Schüler Zinoffski und Jaquet bei der Schwefelbestimmung im Hämoglobin verfahren, welches Verfahren auch mit demjenigen von Hammarsten übereinstimmt.

Aus der rauchenden Salpetersäure wurden die Spuren vorhandener Schwefelsäure durch Destillation mit Bariumnitrat entfernt. Die Salzsäure wurde zu demselben Zwecke mit Bariumchlorid destillirt. Das zum Schmelzen angewandte Kalihydrat und der Kalisalpeter waren vollkommen schwefel-

frei. Das Verhältniss der Menge derselben zu der Substanzmenge wurde der Arbeit von Jaquet¹⁾ entnommen. Die Salpetersäure wurde aus der Schmelze durch wiederholtes Eindampfen mit Salzsäure vollkommen entfernt. Der gewogene Bariumsulfatniederschlag wurde immer auf lösliche Bariumverbindungen und zwar immer mit negativem Erfolge geprüft.

Von den zwei Phosphorsäurebestimmungen wurde eine im Filtrate vom Bariumsulfatniederschlag ausgeführt, indem derselbe mit Salpetersäure mehrmals eingedampft, die Salpetersäurelösung mit molybdänsaurem Ammonium gefällt und der Niederschlag wie üblich weiter behandelt wurde. Der dabei erhaltene Phosphorsäuregehalt wurde durch eine zweite Bestimmung controllirt, welche sammt der Kalkbestimmung in einer besonderen Eiweissprobe ausgeführt wurde. Das Eiweiss wurde zu dem Zwecke in Soda gelöst, die Lösung eingedampft und der Rückstand eingeäschert. Die mit Essigsäure angesäuerte Lösung der vollkommen kohlefreien Asche wurde mit Ammoniumoxalat gefällt. Die Phosphorsäure aus dem Filtrate durch directe Fällung mit Magnesiamischung erhalten.

Die Resultate der Analyse gibt die folgende Tabelle an:

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen.

Präparat Aa ₂ .					Präparat Ab ₂ .				
Substanz gr.	CO ₂ gr.	H ₂ O gr.	C %.	H %.	Substanz gr.	CO ₂ gr.	H ₂ gr.	C %.	H %.
0,3455	0,6617	0,2258	52,24	7,26	0,4084	0,7817	0,2700	52,20	7,34 ²⁾
0,3233	0,6218	—	52,45	—	0,4370	0,8428	0,2745	52,59	6,95
0,3929	0,7583	—	52,63	—	—	—	—	—	—
Präparat Ba ₂ .					Präparat Bf ₂ .				
0,3745	0,7184	0,2376	52,31	7,05	0,5656	1,0791	0,3530	52,03	6,93
0,4521	0,8700	0,2892	52,48	7,10	0,4994	0,9537	0,3118	52,08	6,93
0,6256	1,2007	0,4104	52,35	7,28	0,3950	0,7549	0,2489	52,12	7,00
0,8020	1,5343	0,5150	52,19	7,13	—	—	—	—	—

¹⁾ Beiträge zur Kenntniss der Blutfarbstoffe von A. Jaquet, Inauguraldiss., Basel 1889.

²⁾ Dieser durch einen analytischen Missgriff verschuldete zu hohe Wasserstoffgehalt wurde bei der Berechnung der Mittelzahl nicht berücksichtigt.

Stickstoffbestimmungen (gasometrisch).

Präparat Aa ₂ .					Präparat Ab ₂ .				
Substanz	N. Volum	Temperatur.	Barometerstand.	N.	Substanz	N. Volum.	Temperatur.	Barometerstand.	N.
gr.	cbcm.		mm.	%.	gr.	cbcm.		mm.	%.
0,3647	50,7	17,8°C.	736	15,58	0,4013	54,8	21,1°C.	741	15,19
—	—	—	—	—	0,4180	55,6	17,8°C.	740	15,03
Präparat Ba ₂ .					Präparat Bf ₂ .				
0,4959	68,1	18,4°C.	738	15,40	0,3747	50,75	19,8°C.	744	15,23
0,3992	54,0	21,4°C.	742	15,52	0,4331	60,0	23,0°C.	744	15,32
0,4478	63,1	22,9°C.	739	15,49	0,4032	55,7	21,8°C.	741	15,30
0,4115	56,6	20° C.	744	15,45	—	—	—	—	—

Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl.**Präparat Ba₂.**

Substanz.	$\frac{1}{2}$ N-Säure in der Vorlage.	Mit $\frac{1}{10}$ N-Lauge zurückeritriert.	N. %.
1,3922	33 cbcm.	10,3 cbcm.	15,55
1,5390	36 cbcm.	10,2 cbcm.	15,44

Präparat Bf₂.

1,1290	29 cbcm.	21,3 cbcm.	15,33
--------	----------	------------	-------

Controlstickstoffbestimmungen nach Kjeldahl.

1,1215 gr. Harnsäure, 57 cbcm. $\frac{1}{2}$ N-Säure in der Vorlage, 10,8 cbcm.

$\frac{1}{10}$ N-Lauge zurückeritriert, 33,00 % N gef., 33,33 % N ber.

1,2258 gr. Hippursäure, 16 cbcm. $\frac{1}{2}$ N-Säure in der Vorlage, 12,1 cbcm.

$\frac{1}{10}$ N-Lauge zurückeritriert, 7,75 % N gef., 7,82 % N ber.

Schwefelbestimmungen.**Präparat Ba₂.**

3,0412 gr. Substanz.	0,3540 gr. Ba SO ₄ .	1,600 % S.
6,6022 » »	0,7823 » »	1,629 » »

Präparat Ab₂.

1,1343 gr. Substanz.	0,1402 gr. Ba SO ₄ .	1,700 % S.
----------------------	---------------------------------	------------

Präparat Bf₂.

3,1075 gr. Substanz.	0,3801 gr. Ba SO ₄ .	1,684 % S.
2,3726 » »	0,2944 » »	1,705 » »

Kalk- und Phosphorsäurebestimmung.**Präparat Ba₂.**

6,6022 gr. Substanz, 0,0295 gr. Mg₂ P₂ O₇ oder 0,285 % P₂ O₅.

6,4421 » » 0,0293 » » » 0,290 » » 0,0301 gr.

Ca CO₃ oder 0,261 % Ca O.