

Ueber das Verhalten des Caseïns in ammoniakalischer Magnesiumchloridlösung.

Von

Dr. phil. et med. **W. v. Moraczewski.**

(Der Redaction zugegangen am 9. Juni 1895.)

Versetzt man eine Lösung von aschenfreiem Caseïn mit $\frac{1}{3}$ Volum einer Magnesiamixtur¹⁾ und setzt etwa ebensoviel Ammoniak hinzu, so entsteht nach einigen Tagen ein Niederschlag, welcher aus Sphärolithen (Hofmeister) besteht.

Diese Beobachtung habe ich vor fünf Jahren gemacht, als ich im physiologischen Institute des Herrn Prof. J. Gaule in Zürich arbeitete. Dazumal war ich mit Darstellung von reinem Caseïn beschäftigt und hoffte durch das wiederholte Fällen mit Magnesiamixtur den Phosphor davon zu trennen. Ich beobachtete nun, dass die Fällung mit Magnesiamixtur trotz der Reinheit des Caseïns sich wiederholte. Da ich aber den Niederschlag meistens am zweiten Tage beobachtete, so waren die Sphärolithen zu klein und zu schlecht ausgebildet, um ein Interesse zu erwecken. Als ich bei Anlass meiner Arbeit über Verdauungsproducte von Caseïn mit Herrn Prof. Dr. E. Drechsel über diese Beobachtung sprach, wurde ich von demselben bewogen, die Untersuchung weiter zu führen, da nach seiner Ansicht jene Fällung vielleicht krystallinisch zu erhalten wäre. Durch diese Worte des Prof. Drechsel angeregt, der wohl in diesem Gebiet als Autorität anzusehen ist, versuchte ich durch Verschaffen grösseren Materials und Variiren der Ausscheidungsverhältnisse zu etwas bestimmteren Resultaten zu kommen. In diesen Bemühungen wurde ich auf die freundlichste Art von Herrn Prof. Drechsel brieflich unterstützt, wofür ihm mein aufrichtigster Dank gebührt, ebenso dem Herrn Prof.

¹⁾ Die Magnesiamixtur wird bereitet, indem 83 gr. Magnesiumsulfat mit 5 ccm. Salzsäure in Wasser gelöst durch 82 gr. Baryumchlorid versetzt werden. Das Baryumsulfat wird abfiltrirt. Das Filtrat mit 165 gr. Chlorammonium und 260 ccm. Ammoniak auf 1 Liter gebracht.

Eichhorst, in dessen Laboratorium ich den grössten Theil der Versuche gemacht. Der Schluss wurde im med.-chem. Laboratorium der Universität Krakau ausgeführt.

Die Methode, welche ich benutzte und die vom Prof. Drechsel approbirt wurde, war folgende: Aschenfreies Casein nach Hammarsten dargestellt¹⁾, also drei bis vier Mal wiederholt mit Essigsäure nach Auflösen in verdünnter Natronlauge gefällt, wurde in Ammoniak aufgelöst und filtrirt. Die Lösung soll möglichst concentrirt sein. Nach dem Filtriren wird die Caseinlösung mit dem gleichen Volum Magnesiummischung und $\frac{1}{4}$ Volum Ammoniak versetzt, wobei keine Trübung entstehen darf; wenn solche vorhanden wäre, muss die Lösung nochmals filtrirt werden. Bei gut gereinigtem Casein geschieht dies nie. Die Lösung bleibt mehrere Wochen stehen, wobei eine Verdunstung nicht schadet, eher die Krystallisation befördert.

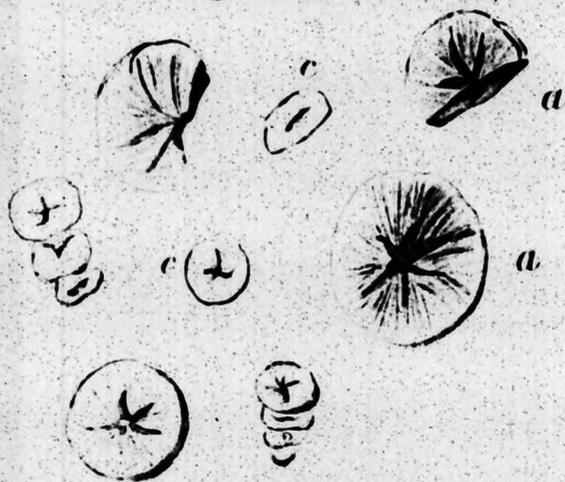


Fig. I. Sphärolithen.

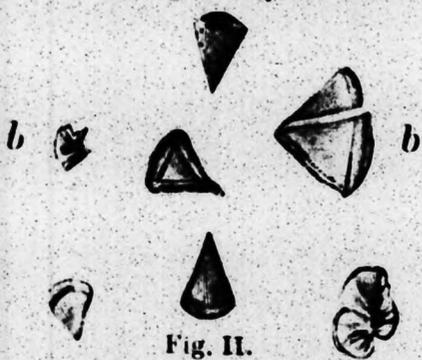


Fig. II.

Zerfallene Sphärolithen.

Nach dieser Zeit ist der Boden des Glases mit einem schwachen Niederschlage bedeckt, welcher mikroskopisch kleine Kugeln mit strahligen Figuren zeigt²⁾. Die Gebilde sind meist sehr regelmässig gebaut und die bei *c* Fig. I abgebildeten Figuren kommen selten vor. Drückt man auf das Deckglas, so zerfallen die Sphären zu Segmenten, wie sie bei *b* Fig. II dargestellt sind. Lässt man den Niederschlag, ohne die darüber stehende Flüssigkeit abzugliessen, noch mehrere Wochen stehen, so werden die Sphärolithen zu Nadeln, welche bald gruppirt, bald vereinzelt in der Mutterlauge schwimmen. Manche stecken noch in der

Flüssigkeit abzugliessen, noch mehrere Wochen stehen, so werden die Sphärolithen zu Nadeln, welche bald gruppirt, bald vereinzelt in der Mutterlauge schwimmen. Manche stecken noch in der

¹⁾ Zur Kenntniss des Caseins etc. Upsala 1877.

²⁾ Die Grösse der Sphärolithen entspricht etwa der Grösse der Magnesiumammoniumphosphatkrystalle, wie sie im alkalischen Harn vorkommen.

Mutterform, andere zeigen durch ihre Gruppierung die Herkunft, noch andere liegen vereinzelt. Diese Nadeln wurden durch Herrn Prof. Grubemann in Zürich gütigst untersucht, der sie als echte Krystalle erklärte und ihr Verhalten im polarisirten Licht prüfte, wobei er eine gerade Auslöschung desselben an ihnen gefunden hatte. Leider ist die Ausbeute eine so geringe gewesen, dass bei den ersten Versuchen das Material nicht ausreichte, um daran irgend welche Prüfungen anzustellen.

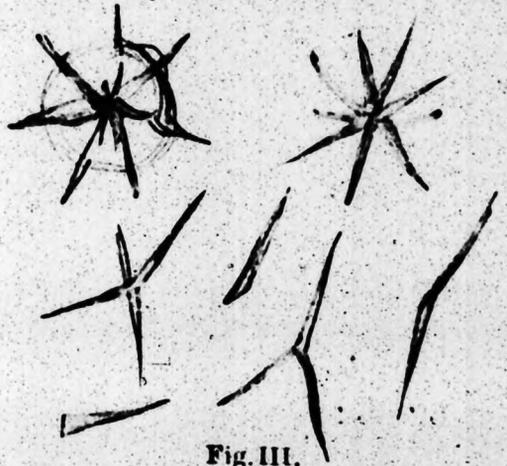


Fig. III.
Entstehung der Eiweisskrystalle.

Modificationen. Versetzte man Caseinlösung mit Ammoniumsulfat, so wurde die entstehende Trübung auch nach langem Stehen nicht krystallinisch (nach Hofmeister).

Setzt man Magnesiumchlorid allein hinzu, so entsteht eine Trübung, welche jedoch nie die Sphärolithenformen zeigte.

Uebersättigt man die Caseinlösung mit Ammoniak, nachdem sie vorher mit Magnesiainmischung versetzt wurde, so sind die Sphärolithen kleiner. Ich habe in einer Probe, dem Rathe des Herrn Prof. Drechsel folgend, die Caseinmagnesiainmischung mit Ammoniak übersättigt und in einem Glas verschlossen, welches mit gut eingeschliffenem Glasstöpsel versehen war. Die Sphärolithen waren in dieser Probe kleiner, die Menge des Niederschlages war ziemlich die gleiche.

Die Anwendung von Kälte wurde leider zu wenig versucht, um über ihren Einfluss Sicheres zu sagen, dagegen wirkt eine Durchleitung von Kohlensäuregas auf die Ausscheidung begünstigend.

Es scheint also, dass das Ammoniak wohl nothwendig ist zur Entstehung der Krystalle, aber ihr Wachsthum wird durch einen Ammoniaküberschuss eher verlangsamt, denn alle Proben, welche durch Löschblatt und Glas bedeckt waren, wo also das Entweichen des Ammoniaks möglich war, zeigten grössere Formen der Sphärokrystalle. Wie schon erwähnt, ist das Verdunsten weniger wirksam als ein Zusatz von frischer

Magnesiainmixtur, in welchem Fall in der von den Krystallen abgegossenen Flüssigkeit ein neuer, wenn auch geringer Niederschlag zu entstehen pflegt.

Auf diese Weise erhaltene Sphärolithen sind den von Hofmeister¹⁾ entdeckten, von Gabriel²⁾ und Bondzynski und Zoja³⁾ untersuchten Gebilden sehr ähnlich. Nicht nur der Form nach, sondern — was viel wichtiger erscheint — dem Verhalten nach. Denn auch die Caseinsphären zerfallen in Nadeln und die Gruppierung der Nadeln und ihr Aussehen erinnert so sehr an das Tyrosin, aus Ammoniak krystallisirt, dass auch mir der Vergleich damit am passendsten erscheint. Es fehlt aber nicht an Unterschieden, wie wir sehen werden. Die Caseinsphärolithe zerfallen nicht so bald wie die Albuminsphärolithe von Hofmeister und diesen Umstand benutzte ich, um die Vorstufen der Krystalle zu untersuchen, soweit es das Material erlaubte. Ich wurde dazu umsomehr veranlasst, da die Nadeln sehr lange darauf warten lassen, bevor sie von den Sphärolithen zu trennen sind. Dabei ist die Ausbeute von beiden eine so geringe, dass man kaum genug Rohmaterial dazu verwenden kann. So gaben etwa 30 gr. Casein kaum 0,3 Sphärolithen. Ich habe nun eine Partie davon als Sphärolithen untersucht, die andere soll als Nadeln untersucht werden.

Die Sphärolithen von Casein zeigen die oben dargestellten mikroskopischen Bilder. Mit Säuren unter dem Mikroskop behandelt, werden sie blass, behalten aber ihre Form, was die Hofmeister-Krystalle ebenfalls zeigten. Mit Natronlauge und Kupfersulfat behandelt, nehmen sie eine röthlich-violette Farbe an. Mit Salpetersäure geben sie die Xantoproteinreaction; mit Schwefelsäure werden sie bräunlich gefärbt; beim Verbrennen geben sie den charakteristischen Geruch nach verbranntem Eiweiss.

In Säuren lösen sich die Sphärolithe schwer, ebenso im reinen Wasser, dagegen leichter in Salzlösungen, aus welchen sie durch Hitze oder Säurezusatz ausgefällt werden. Somit zeigen sie das Verhalten der Globuline. In schwacher (0,1 proc.) Salzsäure lösen sie sich schwer. Verdaut man sie mit Hilfe

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XIV, XV, XIX.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XVI.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XIX.

von Pepsin, so zeigen sie einen Bodensatz, welcher wie Nuclein aussieht. Abfiltrirt und mit verdünnter Salzsäure gewaschen, zeigte der Niederschlag beim Verbrennen mit Salpersäure auf nassem Wege reichlichen Phosphorgehalt. Dieses Verhalten würde für Casein sprechen, wenngleich die Unlöslichkeit in Salzsäure damit nicht übereinstimmt.

Eine Portion wurde mit schwacher Salzsäure (0,1 bis 0,2 proc.) behandelt, behufs Auflösung der damit verbundenen Mineralbestandtheile, das Eiweiss wurde zur Verdauung verwendet, das Filtrat wurde mit Natronlauge destillirt und die Destillationsproducte in titrirter Schwefelsäure aufgefangen. Zum Schluss der Destillation wurde Wasserdampf durchgeleitet, um Spuren von Ammoniak zu entfernen. Die vorgelegte Schwefelsäure wurde unter Benutzung von Cochenille als Indicator retitirt. Es wurde kein Ammoniak nachgewiesen. Dagegen gab eine Probe der ursprünglichen Substanz mit Nessler's Reagens eine deutliche Gelbfärbung, was aber bei der Empfindlichkeit der Reaction vielleicht auf das Eiweissammoniak zurückzuführen ist.

Der Aschengehalt wurde zweimal bestimmt und als Mittel 45% gefunden.

Die Asche wurde in einer Portion auf Magnesia, in der zweiten auf Phosphor geprüft und 22,71% Mg, 22,31% P gefunden. Der Gesamtposphor wurde durch Erhitzen mit chem. reiner Salpetersäure und nachfolgender Fällung mit Magnesia-mischung bestimmt. Er wurde zu 17,12% (?) gefunden.

Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt. Das Verbrennen geschah mittelst Schwefelsäure mit Zusatz von Kupfersulfat. Kaliumpermanganat wurde nicht zugesetzt. Die Destillation mit Natronlauge wurde auf die oben erwähnte Weise vollbracht. Es wurde 14,98% Stickstoff gefunden.

Der Kohlenstoff und Wasserstoff wurde durch Verbrennen im Schiffchen bestimmt. Bleichromat und Kupferoxyd dienten als Sauerstoffquellen. Die Verbrennung geschah im Sauerstoffstrom, die Asche wurde im Schiffchen zurückgewogen. Auf diese Weise wurde der Kohlenstoff 51,64%, der Wasserstoff 13,33% (?) gefunden, auf die organische Substanz berechnet.

Der Schwefel wurde durch Verbrennen der Substanz mittelst Salpetersäure und nachfolgendem Zusatz von Baryumchlorid nachgewiesen. Die quantitative Bestimmung wurde unterlassen wegen dem Mangel an Material. Weder Chloride noch Kalksalze konnten in der Substanz nachgewiesen werden. Die ersteren mit Silbernitrat; der Kalk durch oxalsaures Ammonium, wobei selbst nach langem Stehen keine Trübung eintrat. Das Organische der Probe, welche dazu diente, wurde mittelst Salpetersäure zerstört, wie bei der Phosphorbestimmung. Uebrigens war Kalk durch die Reindarstellung des Caseins von vornherein ausgeschlossen.

Die zur Analyse und zu anderen Versuchen benutzte Substanz wurde wie folgt bereitet. Der Niederschlag wurde durch Abgiessen der darüber stehenden Flüssigkeit von derselben befreit. Darauf mit Magnesiamixtur so lange durch Decantation gewaschen, bis kein Eiweiss oder nur schwache Spuren davon abgingen. Darauf wurde der Niederschlag aus verschiedenen Gläsern, wo er abgesetzt wurde, in ein Glas gebracht und, mit Magnesiamixtur bedeckt, stehen gelassen. Nach mehreren Stunden wurde die Magnesiamixtur abgegossen, der Niederschlag auf ein Filter gebracht und getrocknet. Durch das Trocknen wollte ich die eiweisshaltige Substanz gegen das weitere Auswaschen widerstandsfähiger machen. Bekanntlich ist auch das wasserlösliche Eiweiss im trockenen Zustande weniger angreifbar; dagegen beeinträchtigt das Trocknen die Löslichkeit der anhaftenden Salze gar nicht. Der Filterinhalt wurde nun nach dem Trocknen rasch auf einem Saugfilter mit destillirtem Wasser gewaschen, wobei ein kleiner Verlust nicht zu vermeiden war. Das Auswaschen kann aber sehr gut ausgeführt werden, wenn die Sphärokrystalle, welche aus einer Magnesiumchloridlösung ausgeschieden worden waren, keine Spur von Chlor nach dem Waschen zeigten. Nach dem Auswaschen wurde der Niederschlag abermals zum Trocknen gebracht und so zur Analyse verwendet. Das Trocknen geschah durch 110° und Aufbewahren über Schwefelsäure. Die so getrockneten Sphäroide zeigten unter dem Mikroskop dieselben Formen, nur waren die strahligen Figuren weniger

deutlich. Leider war die Menge so gering, dass es unmöglich war, mehr als 0,04 zu einer Bestimmung zu verwenden.

Daher wurde diesmal darauf das Hauptgewicht gelegt, um die Anwesenheit von Eiweiss sicher zu constatiren. Die quantitativen Bestimmungen sollten die Eiweissnatur nur bestätigen. Auf Genauigkeit machen die Zahlen keinen Anspruch, was auch bei der geringen Menge der zur Analyse verwendeten Substanz kaum möglich wäre. So ist der Wasserstoffgehalt wohl zu hoch, möglicherweise ist Krystallwasser daran schuld. Auch der Gesamtposphor ist im Vergleich mit dem Aschenphosphor wohl nicht richtig ausgefallen. Bei so geringen Mengen spielten die hygroskopischen Eigenschaften des Eiweisses eine Rolle, worauf vielleicht der hohe Wasserstoff zum Theil zurückzuführen ist.

Man kann ziemlich sicher behaupten, dass diese Substanz kein Nuclein ist wegen der leichten Verdaulichkeit, am Wahrscheinlichsten ist es Casein oder ein Nucleoglobulin wegen dem hohen Phosphorgehalt, welches der Verdauungsrückstand zeigte¹⁾. Ueber die Natur der Magnesiumverbindung lässt sich nicht viel sagen. Die gefundenen Zahlen sprechen am ehesten für das tertiäre Salz $Mg_3(PO_4)_2$, weil darin 72 Theile Magnesium auf 62 Theile Phosphor kommen. Aber auch andere Formen der Verbindung sind nicht ausgeschlossen.

Kaum zu erwähnen ist, dass die Sphärokrystalle durch Fällen des Caseins, welchem Phosphate zugesetzt wurden, nicht zu erhalten sind. Die Untersuchung des Caseins, welches in der Mutterlauge enthalten war, habe ich unterlassen, da bei dem geringen Procentgehalt an Sphärolithen jenes wohl kaum nachweisbare Veränderungen zeigen würde.

Die von Hofmeister ausgesprochene Meinung, dass die Reinheit des Eiweissstoffes zu den Bedingungen der Krystallisation gehöre, scheint in diesem Falle zuzutreffen, da das aschenfreie Casein wohl zu den reinen Eiweissstoffen gehört. Die gleiche Form der Sphärolithe würde dafür sprechen, dass die Eiweisskörper etwa wie Spinelle oder Alaune eine gleiche Form

¹⁾ Es wurden mit Verdauungsproducten des Caseins ähnliche Versuche gemacht und dabei keine Sphärolithen erhalten.

der Krystallisation besitzen. Umsomehr wäre es erwünscht, die genaue Zusammensetzung des Eiweisses zu kennen, was bei der kleinen Ausbeute bis jetzt nicht gut möglich war.

Wenn ich auch der Lücken, welche meine Untersuchung hat, vollkommen bewusst bin, so halte ich es doch für geboten, dies Wenige in die Oeffentlichkeit zu bringen, damit das, was mir nicht gelingen wollte oder was versäumt wurde, von Anderen ausgeführt werde.

Es sei noch erwähnt, dass die Magnesiamixtur mit Nuclein in ammoniakalischer Lösung einen Niederschlag erzeugt, welcher deutlich krystallinische Struktur zeigt. Ueber die Natur dieses Körpers kann ich vorläufig nichts Näheres aussagen.

Analytische Belege.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung.

0,0425 gr. Substanz gaben 0,0282 gr. Wasser, entspr. **0,00313 H.**

0,0425 » » » 0,0445 » CO₂ » **0,01213 C.**

0,0425 gr. Substanz enth. 0,0190 gr. Asche und 0,0235 gr. org. Subst.,

also 51,64 % C } auf Organ. berechnet.
13,33 % H }

0,0276 gr. Substanz gaben 0,0125 gr. Asche = 45,30 %.

0,0425 » » » 0,0190 » » = 44,71 %

Mittel 45,00 %.

0,0119 gr. Asche gaben 0,0125 gr. Mg₂P₂O₇ entspr. 22,71 % Mg.

0,0194 » » » 0,0155 » » » 22,31 % P.

0,0155 » » » 0,0095 » » » 17,12 % » (Gesamt-P).

0,0467 gr. Substanz gaben 1,1 cbcm. $\frac{1}{4}$ n. Natronlauge entspr. 0,00385 gr. N = 14,98 % N.

Auf die ursprüngliche Substanz berechnet wären:

27,70 % C Asche: 22,71 % Mg.

7,34 % H 22,31 % P.

8,24 % N. Eiweiss: 51,64 % C.

17,12 % P 13,33 % H.

10,22 % Mg 14,98 % N.

Spur S.

Vorliegende Arbeit wurde im med.-chem. Laborat. des Herrn Prof. Dr. Stopezański in Krakau zu Ende gebracht, wofür ich ihm für seine vielfache Hilfe und Anregung meinen Dank ausspreche.

Krakau, den 6. Juni 1895.