

Ueber die Eiweissstoffe der Milch und die Methoden ihrer Trennung.

Von

Dr. med. **A. Schlossmann**,
Specialarzt für Kinderkrankheiten in Dresden.

(Aus dem Laboratorium für organische Chemie an der technischen Hochschule zu Dresden.)
(Der Redaction zugegangen am 6. Mai 1896.)

Forschungen über die Eiweissstoffe der Milch dürfen, abgesehen von der rein wissenschaftlichen Bedeutung, insofern auf ein erhöhtes Interesse Anspruch erheben, als ja eine rationelle künstliche Ernährung des Säuglings ausschliesslich auf genauen physiologischen und chemischen Beobachtungen und vergleichenden Untersuchungen der Milch aufgebaut werden sollte. Freilich ist dieser Forderung, die doch eigentlich als eine ganz selbstverständliche einer weiteren Motivierung nicht bedarf, bislang nicht allenthalben nachgekommen worden und so mancher Irrthum, den ein exacter Versuch mit Leichtigkeit auf der Stelle widerlegt hätte, fort und fort weiter berichtet und weiter vererbt worden, ohne dass von irgend einer Seite ein Einwand erhoben worden wäre. Als charakteristisch in dieser Beziehung möchte ich beispielsweise nur einer Thatsache Erwähnung thun, die sich auf den Gesamteiweissgehalt der Frauenmilch bezieht. Dieser war nämlich, wie zahlreiche Lehrbücher der Physiologie und der Kinderheilkunde übereinstimmend berichten, allgemein auf durchschnittlich circa 2% geschätzt worden. Da die Protein-substanzen früher meist indirect — als Differenz aus dem

Trockenrückstand minus den wasser-, aether- und alkohollöslichen Theilen — bestimmt wurden, darf das wenig wundern. Es ist aber kaum erklärlich, dass dieser hohe Eiweissgehalt als Dogma bestehen blieb, nachdem doch die naheliegende Möglichkeit an die Hand gegeben war, durch die directe Bestimmung des gesammten Stickstoffgehaltes der Milch nach Kjeldahl, eine jede die Eiweisskörper einzeln oder nach ihrer Gesammtausfällung bestimmende Analyse zu prüfen, wie dies bereits früher von Liebermann¹⁾ mit Hülfe der Dumas'schen N-Bestimmung geschehen war. Erst als Heubner²⁾ auf Grund leider nicht publicierter Untersuchungen Hoffmann's, die auf dem Pester Hygienecongress vorgetragene Anschauung Johannessen's³⁾ unterstützte, der als Eiweissgehalt der Frauenmilch 1% angab, hat man frühere, hiermit in guter Uebereinstimmung befindliche Befunde wieder mehr beachtet. Hatte doch bereits Meigs⁴⁾ vor Jahren in wiederholten Publicationen die Behauptung stricte vertreten, dass «human milk contain's ouly about one per cent of casein». Auch andere Autoren gaben, wenn auch meist auf Grund nur weniger Analysen, ähnliche Zahlen; ich erwähne, abgesehen von den durch Heubner angeführten, folgende:

Schmidt⁵⁾: 1,31% Eiweiss in der Frauenmilch gegen 3,6% in der Kuhmilch.

Dogiel⁶⁾: 1,02% (0,91—1,09) gegen 3,61% (3,27—3,82) in der Kuhmilch.

Puls⁷⁾ 0,97%.

¹⁾ Liebig's Annal., Bd. 181, S. 90.

²⁾ Berliner klin. Wochenschrift 1894, Nr. 37 und 38 und im Ber. über den VIII. intern. Congr. für Hygiene und Demographie im Archiv für Kinderheilkunde, 1895, Bd. 18, S. 238.

³⁾ Studien zur Secretionsphysiologie der Frauenmilch. Jahrb. für Kinderheilkunde, 1895, Bd. XXXIX, S. 381.

⁴⁾ Milk Analysis. Philadelphia 1885, bei Blakiston Son and Comp.

⁵⁾ Beiträge zur Kenntniss der Frauen- und Kuhmilch. Inaug.-Diss. Moskau 1882.

⁶⁾ Zeitschrift für physiol. Chemie, 1885, Bd. IX, S. 591.

⁷⁾ Pflüger's Archiv für die ges. Phys., Bd. XIII, S. 176.

Des weiteren findet sich bei Gorup-Besanez¹⁾ aufgezählt:

Henry und Chevallier mit 1,52%.

L'Heritier mit 1,30%.

Doyère mit 1,25%.

Diesen relativ niedrigen Zahlen stehen nun unverhältnissmässig hohe anderer Beobachter gegenüber, so dass sich bei Gorup-Besanez als Durchschnitt 2,811%, bei König sogar 3,78% ergibt. Unter den einzelnen Vertheidigern dieser höheren Eiweisswerthe ist es vor allem Pfeiffer, der sich durch seine vortrefflichen milchanalytischen Arbeiten ein unbedingtes Recht auf Beachtung, allerdings gerade in diesem Falle auch auf Widerlegung, erworben hat. Er bleibt auch in seinen neuerdings veröffentlichten weiteren 100 Analysen²⁾ bei seinen früheren Angaben stehen und findet als Mittel 1,944% Eiweiss. Diese Zahl macht auch Biedert³⁾ zur seinigen, nachdem er bereits im Jahre 1874⁴⁾ den Caseingehalt der Muttermilch auf 1,5 bis 2,4% bestimmt hatte. Sind nun, so muss man doch jedenfalls zunächst fragen, die Differenzen in den beiden sich gegenüberstehenden Gruppen von Beobachtern, von der die eine mit Heubner für einen Eiweissgehalt von 1%, die andere mit Pfeiffer für einen solchen von 2% eintritt, abgesehen von der wissenschaftlichen Seite dieser Frage, von einer weitergehenden Bedeutung? Unschwer ist die Antwort hierauf in unbedingt bejahendem Sinne zu geben. Haben doch derartige Untersuchungen, wie auch Pfeiffer⁵⁾ betont, den eminent praktischen Werth für die künstliche Ernährung eine bestimmte Grundlage zu bieten. Schwanken nun die Angaben für den Gehalt eines der wichtigsten Bestandtheile der Frauenmilch — obschon deren Zu-

¹⁾ Lehrbuch der physiol. Chemie, III. Aufl., 1874.

²⁾ 100 Analysen von ausgebildeter menschlicher Milch. Verhandl. der XI. Versammlung der Gesellschaft für Kinderheilkunde, S. 126.

³⁾ Lehrbuch der Kinderkrankheiten.

⁴⁾ Virchow's Archiv, Bd. LX, S. 256.

⁵⁾ Verhandlungen der XI. Versammlung der Gesellschaft für Kinderheilkunde, S. 132.

sammensetzung sonst eine relativ constante, d. h. bei der gleichen Untersuchungsmethode sich ziemlich nahestehende Werthe ergibt —, so muss auch das ganze kunstvoll aufgebaute Gebäude der künstlichen Ernährung mitwanken und stürzen. Nun gibt es aber glücklicher Weise einen Anhaltspunkt, der unzweideutig eine Probe gestattet, ob die durch Ausfällung und Trennung erhaltenen und durch Gewicht bestimmten Eiweisskörper in ihrer Summe dem Eiweisswerthe entsprechen, den man durch Ermittlung des Gesamt-N-Gehaltes nach Kjeldahl zu erwarten hat. Dies Verfahren, das, wie schon erwähnt, bereits früher von Brunner und Liebermann angewandt worden war, ist neuerdings in vortrefflicher Weise von J. Munk¹⁾ ausgearbeitet und erprobt worden. Bei den geringen Anhaltspunkten, die uns an die Hand gegeben sind, um die völlige Reinheit der einzelnen Eiweissstoffe, ihre absolute Trennung von allen andern in der Milch enthaltenen Körpern, die wir ja vielleicht noch nicht einmal alle kennen, festzustellen, ferner bei unserer Unkenntniss über die Veränderungen, die die labilen Eiweissstoffe bei höherer Temperatur, welche zur Erzielung des constanten Gewichtes von Nöthen ist, erleiden, scheinen mir alle Wägungsmethoden von vornherein den Keim der Unzulänglichkeit in sich zu tragen. Auch für die Ermittlung der einzelnen getrennten Protein-substanzen dürfte die von Sebelien²⁾ empfohlene directe Verbrennung nach Kjeldahl anzurathen sein. Unbedingt verlangt werden muss die N-Bestimmung in der Gesamtmilch als Controlle der für die einzelnen Eiweisskörper gefundenen Werthe. Zu diesem Zwecke kann man entweder zunächst an der erhaltenen N-Zahl eine Correctur in dem Sinne anbringen, dass man einen Theil des gefundenen Stickstoffes als nicht auf Eiweiss, sondern auf Extractivstoffe kommend in Abzug bringt. Da aber diese Extractivstoffe noch eine terra incognita sind, sowohl in Bezug

¹⁾ Zur quantitativen Bestimmung der Eiweiss- und Extractivstoffe in der Kuh- und Frauenmilch. Virch. Arch., Bd. 134.

²⁾ Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweisskörper mit besonderer Rücksicht auf die Milch. Ztschr. f. phys. Chem., Bd. XIII, S. 135.

auf ihr qualitatives als auch auf ihr quantitatives Vorkommen, ja, ihr obligatorisches Vorhandensein mir in absolut frischer Milch noch durchaus nicht ganz sichergestellt zu sein scheint, so dürfte sich die Umrechnung des gesammten N in Eiweiss um so mehr empfehlen, als ja durch nichts auszuschliessen ist, dass auch der ev. in Form sogenannter Extractivstoffe dem kindlichen Organismus einverleibte Stickstoff diesem zu Gute kommen kann. Meine Bedenken gegen die normale oder auch nur regelmässige Anwesenheit von Extractivstoffen in frisch gemolken zur Untersuchung gekommener Milch stützen sich darauf, dass ich häufig, sowohl bei der Gesamtfällung der Eiweissstoffe, sei es nach der von Munk modificirten Ritthausen'schen Methode, sei es nach der Verwendung von Tanninlösung, als auch nach der fractionirten Darstellung der Eiweisskörper das Schlussfiltrat N-frei fand und dass sich zeigte, dass aller durch Verbrennung der Gesamtmilch ermittelte N an Körper gebunden ist, welche durch Eiweissfällungsmittel niedergeschlagen werden. In anderen Fällen wieder fanden sich kleine Differenzen zwischen dem direct aus der Milch resp. dem aus den ausgefällten Eiweisskörpern erhaltenen N, die sogar bis zu der von Munk angegebenen Höhe von 9 resp. 5% kamen, doch war das, wie gesagt, die Ausnahme.

Sehr hüten muss man sich selbstverständlich, einen bei Verwendung von Tannin im Filtrat auftretenden N-Gehalt ohne Weiteres als aus der Milch stammend anzusprechen, da die Gerbsäure, wie bei ihrer Provenienz leicht erklärlich, mit stickstoffhaltigen Substanzen verunreinigt sein kann. In dem von mir benutzten, der Firma Gehe & Comp. entstammenden Präparat betrug der N-Gehalt fast 0.1%, wie häufig wiederholte, nach Kjeldahl ebenso wie volumetrisch ausgeführte Bestimmungen ergaben. Um mich nach dieser Seite zu sichern, habe ich immer grössere Quantitäten der üblichen Tanninlösung angefertigt und alsdann in 50 gr. derselben den N ermittelt und den erhaltenen Fehlercoefficienten in Abrechnung gebracht.

Will man, was man nach meiner Ansicht ganz ruhig thun kann, die Extractivstoffe überhaupt ausser dem Spiele-

lassen, so multiplicirt man die für den Stickstoff gefundene Procent- oder Gewichtszahl mit einem Factor, der sich ohne Weiteres aus der Formel für das rein dargestellte Casein ergibt und beim Menschen und den verschiedenen Säugethierarten (soweit bisher bekannt) nur um relativ Geringes differirt. Es ergibt sich hierbei :

Für Frauenmilch (Wróblewski)¹⁾ 6,67.

Für Kuhmilch (Hammarsten)²⁾ 6,37.

Für Ziegenmilch (Schlossmann)³⁾ 6,32.

Zu bedenken ist dabei, ohne dass freilich ein grosser Fehler hierdurch bedingt würde, dass alle Eiweissstoffe als Casein in Rechnung gesetzt werden; da aber genaue Analysen des Frauenmilch-Albumines ebensowenig wie für das Albumin der verschiedenen Hausthiere vorliegen, so wird man schon am besten daran thun, das Albumin mit demselben Factor wie das Casein zu multiplizieren, da glücklicherweise ja gerade im N-Gehalte beider Körper nur relativ geringe Unterschiede vorhanden sind. Munk⁴⁾ hat einen anderen Ausweg versucht, indem er in der Kuhmilch den N-Gehalt aller gemeinsam ausgefällten Eiweisssubstanzen ermittelte. Da aber, wie des Späteren noch näher ausgeführt wird, das Verhältniss der einzelnen Eiweisskörper zu einander kein feststehendes, sondern vielmehr ein sehr wechselndes ist, so lässt sich bei dem Verfahren schwerlich ein Vortheil erblicken.

Man könnte übrigens noch auf einem anderen Wege versuchen wollen, die praktische Seite der uns beschäftigenden Frage zu lösen, indem man nach ein und derselben Methode — sagen wir nach der von Pfeiffer geübten — die Eiweissstoffe sowohl der Frauen- als auch der Kuhmilch quantitativ bestimmt und nun gewisse Verhältnisszahlen ermittelt. Aber abgesehen davon, dass dieser Weg als der weniger directe auch der weniger empfehlenswerthe ist, haben wir von vorn-

¹⁾ Inaug.-Diss., Bern 1894.

²⁾ Lehrbuch der physiol. Chemie.

³⁾ Zur Chemie der Ziegen- und der Schweinemilch (soll demnächst in dieser Zeitschrift veröffentlicht werden).

⁴⁾ Loc. cit.

herein das Bedenken, dass sich die Eiweissstoffe der Frauen- und der Kuhmilch, wenigstens gilt dies sicher für das Casein, vielen Fällungs- wie Lösungsmitteln gegenüber recht verschieden verhalten, so dass hierdurch schon jede proportionale Vergleichung unmöglich wird.

Wenden wir uns nunmehr der Betrachtung der verschiedenen in der Milch enthaltenen Eiweissstoffe zu — unsere Untersuchungen beziehen sich auf Frauen-, Ziegen-, Schweine-, Esels- und Kuhmilch — so kann man wohl heute sagen, dass wir deren drei Arten zu unterscheiden haben. Das ist erstlich das für die Milch charakteristische Casein, in zweiter Linie der dem Serumalbumin entsprechende Körper, das Lactalbumin, das zuerst als unzweifelhafter Bestandtheil auch der frischgemolkenen Milch von Hoppe-Seyler¹⁾ durch Dialyse nachgewiesen wurde und endlich das von Sebelien²⁾ constatirte Globulin. Wer nur einmal nach der von dem letzterwähnten Forscher angegebenen Methode die Trennung der Eiweisskörper versucht und die erhaltenen Producte geprüft hat, kann eigentlich kaum mehr an der Thatsache zweifeln, dass diese 3 Gruppen von Proteinsubstanzen, und nur diese drei, in der Milch präformirt existiren. Dabei kann jedoch die Frage zunächst offen bleiben, ob jede dieser Gruppen nur aus einem chemischen Individuum besteht oder aber ob verschiedene Modificationen desselben vorhanden sind. Für das Lactalbumin scheint mir das letztere das Wahrscheinlichste, ebenso wie ja kürzlich für das Albumin des Eies das Nebeneinander-Vorkommen verschiedener Albuminmodificationen durch die fractionirte Krystallisation nachgewiesen worden ist³⁾. Natürlich muss jede der Fractionen auch ein wirkliches Albumin sein, es darf an den für Albumin charakteristischen Eigenschaften keine völlig fehlen und selbstverständlich muss die Elementaranalyse die gleichen Bestand-

¹⁾ Untersuchungen über die Bestandtheile der Milch und ihre nächsten Zersetzungen. Virchow's Archiv, Bd. XVII, S. 417.

²⁾ Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper der Kuhmilch. Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. IX, S. 445.

³⁾ Bondzynski und Zoja: Ueber die fractionirte Krystallisation des Eieralbumins. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIX, 1894, S. 1.

theile in entsprechenden Proportionen ergeben. Sonst kann man eben nicht von verschiedenen Fractionen ein und desselben Körpers, sondern nur von verschiedenen Eiweissarten sprechen. Verfährt man, wie gesagt, nach den Angaben Sebelien's, die später von demselben noch erweitert¹⁾ worden sind, so kann man sich unschwer von der Richtigkeit seiner Angaben überzeugen, die sich allerdings leider in erster Linie nur auf die Kuhmilch erstrecken. Trotzdem ist die präformirte Existenz dreier verschiedenartiger Eiweisskörper heute noch kein völlig feststehender Lehrsatz, indem Einwände in doppelter Richtung hiergegen erhoben worden sind. Einerseits hat man nämlich an Stelle der 3 von uns angenommenen Eiweissgruppen eine viel grössere Anzahl derselben aufgestellt. Auf die Versuche besonders von Danilewsky und Radenhausen²⁾ hin hat Hammarsten³⁾ diese Frage einer neuen Prüfung unterzogen und durch seine subtilen Untersuchungen die Nichtigkeit der vorgebrachten Einreden erwiesen.

Gingen die eben erwähnten Bestrebungen dahin, die Zahl der in der Milch anzunehmenden Eiweisskörper ins Unermessbare zu vermehren, so ist auf der anderen Seite einer Richtung Erwähnung zu thun, die im strikten Gegensatze hierzu nur einen Eiweisskörper — nämlich das Casein — anerkennt und von diesem annimmt, dass er sich in mehreren verschiedenen Modifikationen in der Milch findet, die als a, b, c u. s. w. Casein unterschieden werden. Hauptvertreter dieser unitären Auffassung sind Duclaux⁴⁾, der eine gelöste, eine feste und eine gequollene Modifikation des Caseins annimmt, Pfeiffer⁵⁾ und sich diesen anschliessend Biedert⁶⁾.

1) Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweisskörper mit besonderer Rücksicht auf die Milch. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XIII, 1883, S. 135.

2) Untersuchungen über die Eiweissstoffe der Milch. Forschungen auf dem Gebiete der Viehhaltung und ihrer Erzeugnisse. Heft 9.

3) Zur Frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff sei. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. VII, 1882/83, S. 227.

4) Comptes rendus, Tom. XCVIII, 1884.

5) Analyse der Milch, Wiesbaden 1887.

6) Die Kinderernährung im Säuglingsalter.

Letztere beiden Autoren unterscheiden a-Casein: durch Säure und Lab fällbar, b-Casein durch Erhitzen gerinnend, c-Casein, das leicht spontan (auch wieder durch Lab) aber nie durch Säure in Kälte und Wärme coagulirt, d-Casein, durch Tannin fällbar.

Anzugreifen ist bei dieser Eintheilung zunächst die verfehlte Bezeichnung als a-, b- u. s. w. Casein, die nach den Gepflogenheiten der organischen Chemie den Gedanken nahelegt, als ob es sich hier um isomere Körper handle. Betrachtet man aber weiter das sogenannte a-Casein und das b-Casein, so erkennt man in ihnen unschwer das Casein und das Albumin unserer Eintheilung wieder, nur dass ein Theil des Caseins der in Folge mangelhafter Methoden sich der Fällung entzogen hat oder aber wieder gelöst worden ist, als c-Casein wieder auftaucht und dass ein beträchtlicher Theil des Albumins — worauf später noch zurückgekommen werden wird — durch das Kochen abgespalten im Verein mit dem Globulin als Eiweissrest durch Tannin gefällt und hierbei den Namen d-Casein erhält. Als fundamentaler Fehler dieser Eintheilung ist der Umstand zu bezeichnen, dass als «Modificationen» eines und desselben Stoffes 2 Körper bezeichnet werden, von denen der eine — und noch dazu in doppelter und complicirter Bindung — Phosphor enthält (a-Casein resp. Casein), während dieser dem anderen (b-Casein-Albumin) völlig fehlt.

2 Körper, die sich durch die Anwesenheit resp. das Fehlen eines Elementes unterscheiden, kann man nicht als «Modifikation» ein und derselben Substanz bezeichnen, ohne die gesammten chemischen Anschauungen umzustürzen, ebensowenig wie es etwa Jemandem beispielsweise beikommen wird, Trimethylphosphinoxid und Methylalkohol als Modifikationen des Methans aufzufassen und mit a- resp. b-Methan zu benennen. Nun leugnen zwar Pfeiffer absolut und Biedert mit einer gewissen Einschränkung (sehr problematisch) die Anwesenheit des Serumalbumins in der ausgebildeten Milch, während sie dieselbe für das Colostrum zugeben. Vergeblich aber sucht man nach einer Stütze für diese Ansicht und nirgends sind die Befunde Sebelien's, die ich voll bestätigen kann, widerlegt worden. Ja, Sebelien

hat sogar ausdrücklich darauf hingewiesen, dass das Albumin der Milch dieselben optischen Eigenschaften besitzt wie das des Colostrums, dem Pfeiffer und Biedert ohne Weiteres einen Albumingehalt zusprechen. Zu welcher Zeit der Lactationsperiode würde denn plötzlich der Albuminkörper der Milch seinen qualitativen Charakter so verändern, dass er seines Namens verlustig erklärt und nunmehr als Caseinmodifikation aufgefasst werden muss?

Wir werden auf Grund unserer eigenen Arbeiten noch völlig die von anderen Autoren schon längst bewiesene Anwesenheit eines Albuminkörpers in der Milch bestätigen können, ja, auf Grund physiologischer Beobachtungen und Erwägungen die Bedeutung gerade dieses Körpers für die Säuglingsernährung in den Vordergrund stellen, zunächst aber müssen wir uns nach dem Grunde umsehen, der sich gerade in der Milchchemie so erfahrenen Beobachtern wie Pfeiffer und Biedert in den Weg stellte und diesen die Erkenntniss der richtigen Sachlage verhinderte. Die Ursache hiervon ist in den verwandten Methoden zu suchen, die die Trennung der einzelnen Eiweisskörper nicht vollkommen ermöglichte oder aber auf die labile Structur derselben so heftig einwirkte, dass Kunstproducte — malträtirtes Casein, wie Pfeiffer es sehr treffend nennt — den klaren Ausblick hinderten.

Die Trennung der Eiweisskörper der Milch — ihre fractionirte Darstellung — konnte bisher auf 3 Wegen angestrebt werden.

Die erste und älteste ist die von Hoppe-Seyler¹⁾ gelehrt Methode. Derselbe verdünnt die Milch auf das zwanzigfache Volumen, setzt unter Umrühren tropfenweise verdünnte Essigsäure zu, solange, als sich ein flockiger Niederschlag zeigt, leitet dann durch die Flüssigkeit einen Strom von CO_2 , $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Stunde lang hindurch und lässt nun einige bis 12 Stunden zur Klärung stehen. Im Filtrat befinden sich, nachdem man mit Wasser nachgewaschen hat, Albumin, etwas gelöstes Casein, Zucker und Spuren von Pepton. Aus dem Filtrat wird das Albumin durch Sieden erhalten, der Rest des Caseins

¹⁾ Handbuch der physiol. u. pathol. chem. Analyse, Berlin 1883.

durch Eindampfen bis zur Consistenz des dünnen Syrup. Abgesehen davon, dass wir es hier mit einer recht complicirten Methode zu thun haben, die ein langes Stehen der eiweisshaltigen Flüssigkeiten und damit unzweifelhaft auch Veränderungen bedingt, wie schon aus dem regelmässigen Peptonbefunde hervorgeht, ist die Verwendbarkeit für die Frauenmilch zunächst ausgeschlossen, da diese nur unvollkommen durch Essigsäure und CO_2 ausgefällt wird. Des Weiteren haftet ihr der Mangel an, dass die ausgefallten Producte im Säureüberschuss sich wieder lösen, dass es ferner nicht möglich ist, das Albumin völlig durch Sieden auszufällen und dass ein Theil desselben mit dem wiedergelösten Casein zusammengerechnet werden muss. Trotzdem enthielt das Schlussfiltrat immer noch Spuren von Eiweiss. Diese Methode ist nun in gewisser Beziehung von Pfeiffer verbessert worden, insofern als derselbe erstmals feststellte, dass in der Frauenmilch nach Zusatz einer «adäquaten» Säuremenge beim Erwärmen die vorher nicht zu erzielende Coagulation des Caseins eintritt. Eine Verschlechterung bedeutet die Pfeiffer'sche Modifikation der ursprünglichen Methode auf der anderen Seite dadurch, dass er statt der ungleich schonender einwirkenden Essigsäure die Salzsäure verwendete und dadurch, dass eine immerhin recht beträchtliche Temperaturerhöhung von Nöthen ist. Ja, die von Pfeiffer¹⁾ als die günstigste erklärte Temperatur von $50-54^\circ \text{ R.}$, id est $62,5$ bis $67,5$ Celsius — bei manchen Milchproben bedarf es sogar $57-58^\circ \text{ R.}$ id est $71,25$ bis $72,5^\circ \text{ Celsius}$ — involviret schon ohne Weiteres die Gefahr, dass ein Theil des Serumalbumins seine Löslichkeit mit verliert. Dabei ist die Höhe der Temperatur von ganz wesentlichem Einfluss auf die zu erzielenden Resultate: so fand sich aus ein und derselben Milch

bei 45° R. 0,97 % Casein, 0,32 Albumin,
 bei 55° R. 1,148 % Casein, 0,24 Albumin,
 bei 65° R. 1,19 % Casein, 0,142 Albumin.

¹⁾ Kritische Untersuchungen über Muttermilch und Muttermilchanalysen, Bd. XIX, S. 463 des Jahrbuches für Kinderheilkunde.

Weiter erfordert die Filtration des erzielten Niederschlages 12 bis 18 Stunden Zeit. Die von Pfeiffer¹⁾ selbst erzielten analytischen Resultate können auch kaum zu einer weiteren Verwendung auffordern, da er die Möglichkeit ohne Weiteres zugibt, dass sich in dem Schlussfiltrate noch Spuren von Casein resp. Albumin finden. Nun beträgt aber der aus diesem Filtrate mittelst Tannin ausgefällte Eiweissrest nicht selten 30—40% des gesammten Eiweisses! Um nur eines der angeführten Beispiele zu wiederholen: In einer als «eiweissarm» bezeichneten Frauenmilch finden sich: 0,656% Casein, 0,110% Albumin, 0,504% Eiweissrest. Von einer Methode, die mit solchen Fehlerquellen behaftet ist, werden wir wohl besser völlig absehen. Gerade den hohen Anforderungen, die Pfeiffer in präciser Form für milchanalytische Methoden aufgestellt, dass nämlich die einzelnen Eiweisskörper in möglichst reinem Zustande und möglichst direct zu bestimmen sind, wird auf dem eben dargestellten Wege jedenfalls nicht Genüge geleistet werden können.

War hier bei dieser ersten Methode Hoppe-Seyler's resp. Pfeiffer's als zur Ausfällung des Caseins wirksames Princip eine Säure angewandt worden, so bedient sich die zweite nunmehr zur Besprechung gelangende fractionirte Darstellungsart einer anderen Eigenschaft des Caseins, nämlich der, aus seinen «Lösungen» auszufallen, wenn dieselben mit einem Neutralsalze übersättigt werden. Auch hier war es ein Schüler Hoppe-Seyler's, Tolmatscheff²⁾, der wegweisend vorgegangen ist und zwar verwandte er das Magnesiumsulphat, das er so lange zusetzt, bis sich nichts mehr löst. Diese Methode ist von Hoppe-Seyler adoptirt und immer vertreten worden, auch als andere mit derselben nicht zum Ziele gelangten. Ich habe dieselbe in einer Anzahl von Versuchen nachgeprüft und kam dabei zu folgendem Resultate: Verfährt man genau nach der Vorschrift Hoppe-Seyler's³⁾

¹⁾ Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. XXII, S. 14.

²⁾ Zur Analyse der Milch. Med.-chem. Untersuchungen von Hoppe-Seyler, II. Heft, 1867.

³⁾ Handbuch der physiol. und path.-chem. Analyse, S. 492.

oder Tolmatscheff's, so wird man ein brauchbares Resultat nicht erzielen, ein kleiner Ueberschuss des Mittelsalzes genügt zur vollkommenen Abscheidung des Caseïns nicht. Setzt man aber zu der mit concentrirter $MgSO_4$ -Lösung verdünnten Milch mit Sebelien eine beträchtliche Portion eines Krystallbreies von Magnesiumsulphat zu und lässt über Nacht stehen, so erhält man aus Kuh- und Eselsmilch in der That das Caseïn so abgeschieden, dass man es, allerdings unter Anwendung von viel Geduld, filtriren und ein wasserklares Filtrat erhalten kann. Bei der Frauen- und Ziegenmilch habe ich jedoch ein solches niemals erzielen können, dasselbe war vielmehr trotz oder vielleicht gerade wegen des endlosen Filtrirens stets etwas getrübt. Erhitzt man ein solches Filtrat nach Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure und befreit es durch abermaliges Filtriren von demjenigen Theile des Albumins, der durch Erhitzen ausfällbar ist, so erhält man nach abermaliger Fällung vermittelt Tanninlösung eine Eiweissmenge, die die vom Albumin abgespaltene bedeutend übersteigt, auch bei verschiedenen Proben aus ein und derselben Milch sich völlig widersprechende Zahlen ergibt. Im Uebrigen hat gerade für die Frauenmilch Biedert¹⁾ und nach ihm noch viele Andere diese Trennungsmethode als eine ungenügende bezeichnet und an dieser Thatsache kann auch der Protest Hoppe-Seyler's²⁾ nichts ändern. In der Praxis wird sich eben eine jede Methode als unbrauchbar erweisen, die zu ihrer Ausführung so viel Zeit erfordert als die in Rede stehende, da man bei Beendigung der Trennung der Eiweisskörper alsdann nicht mehr die ursprünglichen, in der Milch präformirt vorkommenden, sondern bereits Zersetzungsproducte oder vielmehr Umwandlungsproducte (z. B. Pepton) in solchen Mengen beigemischt erhält, dass man kaum mehr auf die Zusammensetzung der angewandten Milch rückschliessen kann. In der Kuhmilch gelingt die Abscheidung des Caseïns vermittelt $MgSO_4$ beträchtlich leichter als in der Frauen- und

¹⁾ Unterschiede der Menschen- und Kuhmilch, Stuttgart, 1884, S. 23.

²⁾ Ueber Trennung des Caseïns vom Albumin in der menschlichen Milch. Zeitschrift für physiol. Chemie, Band IX.

Ziegenmilch und gerade für das Kuhcasein ist von Sebelien¹⁾ nachgewiesen worden, dass dasselbe, auch wenn es mit Albumin in einer Lösung vermischt ist, von diesem auf diesem Wege quantitativ getrennt werden kann. In der Milch selbst kommt allerdings noch ein anderer Punkt hinzu, der, wenn auch eine relativ geringe, so aber doch principiell wichtige Fehlerquelle involviret; es wird nämlich auch der globulinartige Eiweisskörper zugleich mit dem Casein niedergeschlagen. Dieser gehört aber, wofern man auf seine Isolirung verzichten will, wie später noch des Näheren ausgeführt werden wird, vom physiologischen Standpunkt aus seines Verhaltens wegen eher zum Albuminniederschlage und sollte immer bei letzterem mit verrechnet werden. Dies lässt sich übrigens auch dadurch erreichen, dass man statt des $MgSO_4$ in derselben Weise $NaCl$ in Anwendung bringt: für dies gilt alles eben Gesagte in völlig gleichem Maasse, nur dass eben das Globulin dabei in Lösung bleibt. Man kann alsdann dieses aus dem Filtrate vermittelst $MgSO_4$ ausfällen oder aber man bestimmt sofort durch ein anderes, alles Eiweiss fällendes Mittel den gesammten Eiweissrest, der aus Globulin und Albumin besteht.

Recapituliren wir die Nachtheile, die sich bei der fractionirten Darstellung der verschiedenartigen Eiweisskörper in der Milch mit Hülfe der Mittelsalze geltend machen, so ist in erster Linie daran zu erinnern, dass ein Resultat überhaupt nur bei Kuh- und Eselsmilch, nicht aber bei Ziegen- und Frauenmilch erzielt werden kann, dass aber auch bei ersteren beiden Milcharten diese Methode mit einem beträchtlichen Zeitaufwande und dadurch bedingter Gefahr der Ungenauigkeit verknüpft ist.

Wenden wir uns nunmehr zu der dritten in Betracht kommenden Trennungsart des Caseins vom Albumin, die man im Gegensatz zu den beiden vorher erwähnten als eine rein mechanische bezeichnen könnte. Dieselbe ist in jüngster

¹⁾ Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweisskörper mit besonderer Rücksicht auf die Milch. Zeitschrift für physiol. Chemie, 1883. Bd. XIII, S. 135.

Zeit durch die subtilen Arbeiten Lehmann's, die nach dessen Tode herausgegeben zu haben ein ganz besonderes Verdienst von Hempel¹⁾ ist, wieder in den Vordergrund des Interesses gerückt worden. Es wird hierbei von einer Eigenschaft poröser Thonkörper Nutzen gezogen, die darin besteht, dass sie das Casein zurückhalten, während sie das Albumin durchsickern lassen. Man erhält so die beiden wichtigsten Eiweissarten der Milch getrennt, ohne dass irgend ein chemischer Eingriff erfolgt wäre: aus diesem Grunde bezeichnet Lehmann das so gewonnene Casein resp. Albumin als genuines. Ob sich das Globulin hierbei zum Casein oder zum Albumin hält, geht aus Lehmann's Arbeit nicht hervor, ebensowenig steht mir eine eigene Erfahrung darüber zu Gebote, ich möchte jedoch annehmen, dass sich dasselbe, da ja auch in der Milch gelöst, eher dem Albumin ähnlich verhält und mit durch den Thon durchfiltriert. Lehmann hat des Weiteren die so erhaltenen Casein- und Albuminmengen gewogen und dabei als Mittelwerthe gefunden:

Für Frauenmilch: Casein 1,2%, Albumin 0,5%.

Für Kuhmilch: Casein 3,0%, Albumin 0,3%.

Es verhält sich also Casein zu Albumin in der Frauenmilch wie 12:5, in der Kuhmilch wie 10:1, d. h. mit anderen Worten: auf jedes Gramm in der Frauenmilch consumirtes Casein kommt $4\frac{2}{3}$ mal so viel Albumin als bei Ernährung mit Kuhmilch. Um den Unterschied, der bei Verdünnung mit Wasser, das ja doch der Kuhmilch zugesetzt werden muss, noch eclatanter wird, zu parallelisiren, hat Lehmann den Zusatz eines anderen Albuminkörpers in löslicher Form, und zwar den des Hühnereies, anempfohlen. Somit gebührt Lehmann das Verdienst, als Erster auf die Bedeutung gerade des Albumines für die Säuglingsernährung hingewiesen und auch bereits einen diesbezüglichen Verbesserungsvorschlag für die zumeist angewandte Kuhmilch gemacht zu haben. Abgestritten jedoch muss ihm die für ihn in Anspruch ge-

¹⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 56, S. 558.

nommene Priorität in Bezug auf Verwendung des porösen Thones zur Trennung der Eiweisskörper werden : diese gebührt, nachdem Hoppe - Seyler ¹⁾ bereits 1859 eine thierische Membran zur Scheidung verwandt hatte, dem genialen Manne, der für jedes Problem, das er in Angriff nahm, auch die richtige Lösung fand : Hermann Helmholtz liess durch seinen Schüler Zahn ²⁾ einen Apparat construiren, in dem vermittels eines Thoncyinders, der in einem Glasgefäss, das mit Milch gefüllt war, stand und den er mittelst Anschluss an eine Luftpumpe evacuirte, Casein und Albumin getrennt wurden. Die Methode ist später von Kehler ³⁾ und auch von Hermann ⁴⁾ wieder aufgenommen worden, von Letzterem mit der Modification, dass er statt Thonplatten zerstoßenen Thon verwandte und der Milch als Pulver zusetzte : auch hierdurch gelang es ihm, eine Scheidung des Caseins vom Albumin herbeizuführen.

Nach dem Gesagten kann ein Zweifel darüber nicht bestehen, dass die Verwendung von Thonseparatoren, besonders in der von Lehmann empfohlenen Form, eine exacte Fractionirung der Eiweissstoffe der Milch — wenigstens des Caseins einerseits, des Albumins und Globulins andererseits — gestattet; allerdings sind hierzu ausser gut functionirenden Apparaten grössere manuelle Fertigkeiten erforderlich, wenn man genügende Resultate erzielen will. Auch ist der Aufwand an Zeit kein unbeträchtlicher, so dass man eine Verallgemeinerung dieser Darstellungsart der Eiweisskörper nicht zu erwarten hat. Für physiologische Untersuchungen wird sie allerdings ihren dauernden Werth behalten, da sie die einzige ist, die ohne chemischen Eingriff uns in den Besitz des Caseins und Albumins, wie es in der Milch selbst enthalten ist, bringt. Die Praxis dagegen, der es auf eine rasche

¹⁾ Untersuchungen über die Bestandtheile der Milch und ihre nächsten Zersetzungen. Virch. Archiv, Bd. XVII, S. 417.

²⁾ Zahn: Untersuchungen über die Eiweisskörper der Milch, Pflüger's Archiv, Bd. II, S. 598.

³⁾ Archiv für Gyn., Bd. II, S. 5.

⁴⁾ Pflüger's Archiv, Bd. XXVI, S. 442.

und sichere Entscheidung ankommt, wieviel von den in der Milch enthaltenen Gesamtproteïnsubstanzen auf jede Classe derselben kommt, wird sich nach einer anderen Methode umsehen müssen. Bei den Lehmann'schen Arbeiten kommt noch hinzu, dass dieselben die Eiweissstoffe gewichtsanalytisch bestimmt haben, wodurch wiederum, wie schon erwähnt, Fehlerquellen entstehen können. Ich halte daher die von ihm gegebenen Mittelwerthe wohl was ihr relatives Verhältniss zu einander betrifft, für völlig correcte, nicht aber ihre absolute Höhe. Ein Durchschnittsgehalt von 1,7% Proteïnsubstanz dürfte, wenn man den N, den man durch direkte Bestimmung aus der Milch erhält, berücksichtigt, als zu hoch gegriffen erscheinen.

Ich bin nun in der Lage, eine Methode zu empfehlen, die ebenso einfach als rasch zu beendigen ist und die dabei völlig zuverlässige Resultate ergibt: dieselbe beruht auf der Eigenschaft des Caseïns, mit Alaun eine schwer lösliche Verbindung einzugehen, ohne dass das Albumin oder Globulin hierbei irgendwie beeinträchtigt oder beeinflusst würden. Als ich nämlich nach den Angaben Munk's¹⁾ die Gesamteiweissstoffe der Milch mit Kupferoxydhydratbrei ausfällte und hierbei nur die bei Gegenwart von phosphorsauren Alkalien und Erden theoretische Möglichkeit der Bildung von unlöslichem Kupferphosphat und freiem eiweisslösenden Alkali durch Zusatz von 1 bis wenigen cem. Alaunlösung nach dem genannten Autor ausschloss, mich aber insofern von der gegebenen Vorschrift entfernte, als ich die Alaunlösung nicht kurz vor dem Zusatz des Kupferoxydhydrates zu der schon erhitzten Substanz, sondern schon von vornherein vor dem Erwärmen beifügte, so beobachtete ich eine eigenthümliche Erscheinung. Begann nämlich die so mit Alaunlösung versetzte auf das 10fache mit Wasser verdünnte Milch warm zu werden, so fielen plötzlich massige weisse Flocken aus, die sich bei weiterer Erwärmung nicht mehr lösten, auch sich zunächst nicht vermehrten. Erst nach längerem weiteren Er-

¹⁾ Zur quantitativen Bestimmung der Eiweiss- und Extractivstoffe in der Kuh- und Frauenmilch. Virch. Arch., Bd. CXXXIV, S. 501.

wärmen bei kleiner Flamme tritt eine weitere Trübung ein und beim endlichen Zusatz des Kupferoxydhydrates zu der siedenden Flüssigkeit eine weitere ganz feinflockige, ja zuweilen geradezu staubförmige Fällung. Das hierdurch erhaltene Filtrat war stets eiweissfrei und enthielt keinen oder doch nur Spuren N. Ich bemerke, dass diese ersten Versuche mit ganz frischer Ziegenmilch etwa 1 $\frac{1}{2}$, bis 2 Stunden nach dem Melken angestellt wurden. Es kam nun darauf an, zu constatiren, welcher Art der bei der ersten Fraction ausfallende Eiweisskörper ist, und lag dabei die Vermuthung, seiner Menge und seinem Aussehen nach, nahe, dass es sich um das Casein handle. Die Lösung einer so erhaltenen Probe in Natronlauge liess bei Zusatz von verdünnter Essigsäure einen schneeweissen Körper ausfallen, der allen für Casein charakteristischen Reactionen genügte. Es frug sich nun weiter, ob denn durch Zusatz von Alaunlösung — ich benutzte von nun an ausschliesslich eine concentrirte Lösung von Kalialaun — alles Casein aus der Milch ausgefällt werden konnte. Zu diesem Zwecke musste festgestellt werden, dass das erhaltene Filtrat kein Casein mehr enthalte. Ich setzte daher zunächst zu diesem eine weitere Menge Alaunlösung zu, ohne dass sich die wasserhelle Flüssigkeit auch beim Erwärmen nur im Geringsten trübte. Natürlich war vorher die für die Caseinausfällung mittels Alaun beste Temperatur festgestellt worden und es hatte sich dabei gezeigt, dass die ganz momentane Abscheidung gerade bei 37° Celsius erfolgt.

Ganz dasselbe Verhalten wie die Ziegenmilch zeigten Kuh-, Esels-, Schweine- und Frauenmilch, nur dass letztere, wie ja den meisten Fällungsmitteln gegenüber, etwas feinflockigere Gerinnsel gab. In der Kälte, d. h. bei Temperaturen, die nur irgendwie beträchtlich unter der des Körpers liegen, findet keine momentane Ausscheidung statt! Nur wenn die Milch bereits längere Zeit gestanden und die natürliche Säurebildung schon wesentlich vorgeschritten ist, erfolgt auch bei Zimmertemperatur unter beträchtlichem Zusatze von Alaunlösung eine flockige Ausscheidung. Ist somit das gewöhnliche Optimum der Coagulation auf diesem Wege nach unten mit circa 37°

Celsius begrenzt, so liegt die obere Grenze ebenfalls nicht weit hiervon. Natürlich findet eine Caseinausscheidung auch bei wesentlich höheren Temperaturen statt, man läuft alsdann aber leichter Gefahr, dem Coagulationspunct des Serumalbumins nahe zu kommen. Ich kann daher eine Temperatur von 37° — 40° als die für die Isolirung des Caseins günstigste bezeichnen. Allerdings ändert sich bis 50° nichts an den Befunden. 2 Portionen Milch, beide mit der gleichen Menge Alaunlösung vermischt und die eine auf 40° , die andere auf 50° gebracht, geben beim Verbrennen der Filter nach Kjeldahl übereinstimmende N-Werthe:

10 cbcm. Ziegenmilch bei 40° coagulirt gaben 0,03864 gr. N.

10 cbcm. derselben Milch bei 50° coagulirt gaben 0,03836 gr. N.

Wir sehen somit, dass unwesentliche Schwankungen der Temperatur einen Einfluss auf den Verlauf der Reaction nicht haben und prüfen nun, welche Mengen Alaunlösung am günstigsten sind. Zu diesem Zwecke werden 5 Portionen Ziegenmilch, jede zu 10 cbcm. abgemessen und auf 50 cbcm. verdünnt. Portion I wird mit 2 cbcm., Portion II mit 3 cbcm., Portion III mit 4 cbcm., Portion IV mit 6 cbcm. und Portion V mit 8 cbcm. der concentrirten Alaunlösung versetzt. Alle 5 Proben werden nunmehr auf 40° erwärmt und es zeigt sich alsdann, dass Portion II am raschesten sich in mittel-feinen Flocken absetzt, das darüber stehende Filtrat ist wasserklar; Portion I und III ähnelt der Portion II, doch dauert das Absetzen einige Minuten länger, auch ist die überstehende Flüssigkeit etwas grau opalescirend. Portion IV und V zeigen beträchtlich kleinere Flocken und bedürfen abermals einiger Minuten länger, bis sie sich absetzen, auch hier ist aber das ausgepresste Serum nicht völlig klar. Beim Filtriren geben nun Portion I, II und III übereinstimmend wasserklare Filtrate, während dies bei IV und V nicht der Fall ist, auch nachdem dieselben 5 mal wieder durch das Filter zurückgegossen worden sind. Sie werden daher zur weiteren Verarbeitung verworfen, während die Filter I, II und III übereinstimmenden N-Gehalt zeigen. Die Filtrate werden mit

10 ccm. einer alkoholischen Tanninlösung versetzt und geben ebenfalls entsprechende N-Werthe.

Portion I: Casein 0,04648 gr. N,
 Portion II: Casein 0,04704 gr. N,
 Portion III: Casein 0,04676 gr. N.

Die Tanninniederschläge ergeben:

Portion I: 0,01036 gr. N,
 Portion II: 0,01036 gr. N,
 Portion III: 0,01008 gr. N.

Die Differenzen liegen völlig innerhalb der der Titrationmethode ohnehin eigenen Fehlern. Da auch bei anderen Versuchen immer gleiche Resultate erzielt wurden, so kann man wohl sagen, dass ein auch ganz beträchtlicher Ueberschuss der Fällungsflüssigkeit keinen die Genauigkeit beeinträchtigenden Einfluss ausübt. Die Hauptbedingung ist natürlich, dass man ein wasserklares Filtrat erhält. Die hierzu nöthige Alaunmenge anzugeben ist unmöglich, da dieselbe je nach dem Säuregrade, den die Milch angenommen hat und wohl auch nach dem Salzgehalt schwankt. Ich bin nun in der Weise verfahren, dass ich nicht mehr erst die Alaunlösung zugesetzt und dann erwärmt habe, sondern dass ich umgekehrt die verdünnte Milch zunächst auf 40° erwärmt habe, alsdann aus einer Burette 1 ccm. concentrirte Alaunlösung auf 10 ccm. Milch zugelassen habe, alsdann unter energischem Umrühren je $\frac{1}{2}$ ccm. weitere Alaunlösung, bis ich sehe, dass die mittelflockigen Gerinnsel sich rasch absetzen und die obenstehende Flüssigkeit sich erhellt. Alsdann wird 1, 2 oder wenn nöthig 3 mal, natürlich durch dasselbe Filter, filtrirt und muss alsdann das Filtrat völlig wasserklar sein.

Wir hatten oben bereits erwähnt, dass ein weiterer Zusatz von Alaunlösung zu diesen Filtraten auch bei wiederholtem Wärmen auf 40—50° keine erneute Ausscheidung zur Folge hat und daraus schliessen zu dürfen geglaubt, dass in denselben kein weiteres Casein enthalten ist. Nun könnte man den Einwand erheben, dass sich das Casein zum Theil in dem Alaunüberschuss löst und daher durch vermehrten Zusatz des

Letzteren um so sicherer in Lösung gehalten wird, etwa ähnlich wie ja auch ein Ueberschuss von Salzsäure wirkt. Diesen Einwand haben wir in doppelter Weise von vorn herein widerlegt: Erstlich haben wir den überschüssigen Alaun aus den Filtraten wieder entfernt, indem wir dieselben mit Ammoniak versetzten und den so entstehenden Niederschlag von Aluminiumhydroxyd abfiltrierten. Stumpft man nun das überschüssige Ammoniak mit HCl bis zur neutralen Reaction ab und fügt des Weiteren abermals Alaunlösung zu, so entsteht kein neuer Caseinniederschlag. Auch bei dem Aluminiumhydroxyd finden sich keine Spuren von Eiweiss, das man etwa direkt mitniedergerissen denken könnte, denn löst man den Niederschlag in etwas Natronlauge auf, so findet man diese Lösung eiweissfrei. Ich habe des Ferneren die wasserklaren Filtrate, die ich durch die Abscheidung des Caseins vermittels Alaunlösung erhalten habe, mit Lab versetzt und zwar sowohl mit dem frischen Glycerinextract eines Kälbermagens als auch mit getrocknetem (Pulvis ad serum lactis parandum Gehe), aber in keinem Falle habe ich hierdurch eine Caseinabscheidung beobachtet: es war eben in der That alles Casein bereits durch die Alaunlösung ausgefällt.

Wie aber verhält es sich mit den übrigen Eiweissstoffen der Milch, mit dem Globulin und dem Albumin? Dass beide oder eines von beiden nicht, zum mindesten aber zum Theil nicht mit beim Casein ausgefällt worden sind, geht schon aus der vorhin erwähnten Thatsache hervor, dass sich in dem Filtrate noch Eiweiss findet, das aber nicht Casein sein kann. Weiter lässt sich aus dem Umstande, dass auch bei verschiedenen verwandten Temperaturen unter der Voraussetzung, dass die Coagulationsgrenze des Serumalbumins nicht erreicht wurde und bei verschieden grossem Alaunzusatz die aus den Filtraten erhaltene Eiweissmenge resp. N-Menge bei gleicher Milch auch eine gleiche war, schliessen, dass der Eingriff, der zur Ausfällung des Caseins führte, die andern Eiweissgruppen nicht alterirte. Der stricte Beweis hierfür lässt sich aber mit Leichtigkeit direct erbringen. Fügt man nämlich dem wasserhellen Filtrate, das nach Abscheidung des

Caseïnes durch Alaun erhalten worden ist und in dessen einem Theile man vielleicht noch durch Labzusatz die Abwesenheit aller Caseïnreste ermittelt hat, $MgSO_4$ in Ueberschuss in der Art zu, wie wir sie oben schon bei der Trennung vom Caseïn als die beste beschrieben haben, so erhält man nach längerem Stehen erst eine Trübung und alsdann, nach weiterem Zuwarten, eine Abscheidung einer voluminösen weissen Substanz. Wir bezeichnen dieselbe absichtlich nicht als Niederschlag, da sie nämlich auf der Magnesiumsulphatlösung schwimmt und diese wie eine weiche sahnige Decke überzieht. Am Boden des Glases findet sich dagegen ein Niederschlag des überschüssig zugesetzten Salzes. Das so erhaltene Product, das durch Filtriren und Auswaschen mit gesättigter Lösung von $MgSO_4$ auf dem Filter isolirt wird, kann nichts anderes sein als Globulin. Zu 10 ccm. einer Kuhmilch, die dem Caseïn entsprechend 0,05000 gr. N hatte, fand sich im Filtrate, nachdem weitere 0,00308 gr. N mit $MgSO_4$ ausgefällt waren, noch 0,00588 gr. N die als dem Albumin angehörig betrachtet werden müssen. Es hatte also diese Milch einen Gehalt von :

Caseïn: 0,3185 gr. = 3,185 ‰,

Globulin: 0,0154 gr. = 0,154 ‰,

Albumin. 0,0374 gr. = 0,374 ‰.

Freilich ist für die Praxis die Abtrennung des Globulines ebensowenig anzurathen wie nöthig. Denn in seinem physiologischen Verhalten steht das Globulin dem Albumin so nahe, dass man diese beiden, zumal bei dem relativ unbedeutenden Globulingehalt ruhig zusammen als «wasserlösliches Eiweiss» in Rechnung stellen kann. Am besten fällt man daher den nach Beseitigung des Caseïns bleibenden Eiweissrest zusammen mittels Tanninlösung. Kann man ja durch Kochen allein auch nach Befreiung vom Globulin das Albumin ebensowenig völlig ausfällen als durch Alkohol. Diese Thatsache ist durchaus nichts Neues und bereits in vollem Umfange Zahn¹⁾ bekannt gewesen; auch von Hammarsten und

¹⁾ Untersuchungen über das Serumalbumin. Pflüger's Archiv. Bd III, S. 76.

Sebelien¹⁾ sind entsprechende Beobachtungen gemacht worden; besonders letzterer äussert sich ausführlich über diesen Punkt und berichtet, dass ihm 11—12% des ganzen im Albumin enthaltenen N verloren, d. h. ins Filtrat gegangen sind. Auch Pfeiffer und Biedert sind auf diese Erscheinung gestossen, die natürlich von Ersterem als eine abermalige Modifikation des Caseïns aufgefasst wird. Die Ansichten, wodurch es denn bedingt wird, dass ein Theil des Albumins sich der Coagulation durch Hitze entzieht, können getheilte sein: entweder kann man annehmen, dass ein Theil der sonst zur Albumingruppe gehörigen Eiweissarten eben auch in heissem Wasser seine Löslichkeit bewahrt, d. h. dass es einen präformirten Albuminstoff gibt, der durch Hitze nicht gerinnt. Bedenkt man, dass diese Körper durchaus nicht etwa stets gleichmässig bei einem bestimmten Grade ausfallen, dass vielmehr Concentration und Salzgehalt hierbei eine äusserst wesentliche Rolle spielen, so darf man eine derartige Möglichkeit nicht absolut von der Hand weisen. Auf der anderen Seite kann man allerdings auch mit Zahn und Hammarsten annehmen, dass die Abspaltung des beim Kochen gelöst bleibenden Theiles des Albumines ein Kunstproduct, eben durch die erhöhte Temperatur resp. den Alkoholzusatz, ist. Mir ist übrigens bei den hierauf bezüglichen von mir angestellten Versuchen immer ein grösserer Theil des Albumines in der Siedehitze uncoagulirt zurückgeblieben, etwa ein Viertel bis sogar zu einem Drittel des Gesamtalbumines. Aus diesem Grunde sehe ich auch bei der Milchanalyse von der Coagulation dieses Körpers gänzlich ab, da man ihn eben auf diese Art nicht vollständig erhalten kann und alsdann noch einer weiteren Manipulation zur Gewinnung dieses übrig gebliebenen Restes bedarf.

Um meine Methode der Caseïnisolirung auch noch gegen weitere Einwände zu sichern, habe ich versucht, mittels Alaunlösung das Caseïn aus seinen reinen Lösungen auszufällen. Zu diesem Zwecke wurde von einem Kuhcaseïn, das nach

¹⁾ Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper der Kuhmilch. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. IX, S. 445.

Hammarsten's Vorschrift durch 5 maliges Ausfällen mit Essigsäure und Lösen in Natronlauge dargestellt war, eine gewisse Portion in einer schwachalkalisch gemachten Wassermenge gelöst und zuerst aus 10 cbcm. dieser Lösung durch directes Verbrennen nach Kjeldahl der N-Gehalt festgestellt, alsdann mit concentrirter Alaunlösung das Casein ausgefällt, bis ein weiterer Zusatz von Alaun keine weissliche Fällung, die sich nicht sofort gelöst hatte, hervorrief, filtrirt und das Filter ebenfalls nach Kjeldahl verarbeitet.

Probe I:

10 cbcm. reine Caseinlösung enthalten 0,01918 gr. N.

10 cbcm. derselben Lösung werden mit Alaun ausgefällt; das Filter ergibt 0,01932 gr. N.

Probe II:

10 cbcm. einer anderen reinen Caseinlösung enthalten 0,02128 gr. N.

Das verbrannte Filter mit dem vermitteltst Alaun gefällten Casein ebenfalls 0,01932 gr. N.

Der Versuch, aus einer Lösung von aus Ziegenmilch dargestelltem Serum-Albumin mittels Alaunlösung eine Fällung zu erzielen, scheiterte.

Als einen die Genauigkeit dieser Methode bestätigenden Beweis möchte ich 2 Analysen anführen, die ich an einer mir zu diesem Zwecke von Herrn Bezirksarzt Dr. Hesse¹⁾ gütigst überlassenen Milch ausgeführt habe. Dieser hat, angeregt durch die Hempel'sche Publication der Lehmann'schen Arbeiten, das von Letzterem empfohlene Verfahren des künstlichen Albuminzusatzes modificirt und für eine fabrikmässige Darstellung des löslichen Albumines Sorge getragen²⁾. Dieses pulverisirte Albumin wird zu der durch Verdünnen einer 9proc. Sahne auf 1,2% Casein und 3% Fett gebrachten Milch hinzugefügt und soll nun dieselbe den Lehmann'schen Vorschriften entsprechend 1,2% Casein und 0,5% Albumin enthalten. Das hierbei verwandte Albumin entstammte Hühnereiern und war leicht wasserlöslich.

¹⁾ Cf. Berl. klin. Wochenschrift, 1896, Nr. 30.

²⁾ Verh. der Ges. für Natur- und Heilkunde in Dresden, Sitz. v. 2. Mai 1896.

Es fanden sich nun in je 10 cbcm. derselben Milch:

Probe I:

Casein: 0,13157 gr. oder 1,3157 %₀ entsprechend 0,02072 gr. N.
 Albumin: 0,05515 gr. entsprechend 0,5515 %₀ oder 0,00868 gr. N.
 Gesamt-N-Gehalt direct bestimmt: 0,02884 gr.

Probe II:

Casein: 0,13157 gr. oder 1,3157 %₀ entsprechend 0,02072 gr. N.
 Albumin: 0,057785 gr. oder 0,5778 %₀ entsprechend 0,00910 gr. N.
 Gesamt-N-Gehalt direct bestimmt: 0,02940 gr.

Also auch hier bei diesen complicirten Mischungsverhältnissen hatte sich die Methode völlig bewährt. Dieselbe hat des Weiteren den Vorzug, dass sie überaus einfach und wenig zeitraubend ist. Ich fasse alles, was bei ihr zu beobachten ist, in folgende Vorschrift zusammen, nach der ich selbst jetzt zu arbeiten pflege:

Man nimmt 10 cbcm. Milch (Frauen-, Kuh-, Ziegen-, Schweine-, Eselsmilch) und verdünnt mit 3 bis 5 Theilen Wasser, erwärmt vorsichtig über kleiner Flamme oder besser auf dem Wasserbade unter Controlle des Thermometers auf 40°, setzt alsdann 1 cbcm. einer concentrirten Lösung von Kalialaun zu und wartet unter Umrühren ab, ob eine mittelflockige Coagulation und rasches Absetzen der Coagula erfolgt; ist letzteres noch nicht der Fall, so wird so lange mit dem Zusatz von $\frac{1}{2}$ cbcm. der erwähnten Lösung fortgefahren, bis der Moment der genügenden Coagulation und Abscheidung eintritt. Es muss selbstverständlich immer vor erneutem Alaunzusatz ein Augenblick ($\frac{1}{2}$ Minute) gezögert werden, um zu diesem Absetzen Zeit zu lassen; die Temperatur ist dabei constant auf 40° Celsius zu halten. Ein kleiner Ueberschuss der Alaunlösung (bis 1 cbcm.) schadet sicher nichts. Nach Vollendung der Abscheidung, die bei der Kuh-, Ziegen-, Schweine- und Eselsmilch gross- bis mittelflockig, bei Frauenmilch kleinflockig ist, lässt man einige Minuten stehen und filtrirt dann. Die Abscheidung des Frauenmilchcaseins erleichtert man durch Zusatz von etwas Chlor-natrium in Substanz während des Erwärmens, die Filtration durch Hinzufügen von Calciumphosphat, das mechanisch die feinen Caseinflocken auf dem Filter zurückhält und ihr Durch-

passiren hindert. Nachdem das Filtrat wasserklar geworden ist, wozu es zuweilen des 2 oder 3 maligen Rückgiessens, das aber immer in kurzer Zeit wieder durchfiltrirt, bedarf, und einige Male mit Wasser nachgewaschen worden ist, kann das Filter im Soxhlet-Apparate entfettet werden; auf diese Weise wird das Fett quantitativ erhalten, da dasselbe dem Niederschlage anhaftet. Das entfettete Filter wird nach Kjeldahl verbrannt und der so gefundene Stickstoff auf Casein umgerechnet und als solches in Ansatz gebracht. Das Filtrat wird mit 10 ccm. Tanninlösung versetzt, der entstehende voluminöse Niederschlag abfiltrirt und nach 3 maligem Waschen mit frischem Wasser ebenfalls nach Kjeldahl verbrannt. Der gefundene N wird als Stickstoff des löslichen Eiweisses aufgefasst (Albumin und Globulin) und entsprechend umgerechnet. Dabei soll man nie versäumen, 10 ccm. derselben Milch direct zu verbrennen, um den Gesamtstickstoff kennen zu lernen und sich ein leichtes Controllmittel für jede Analyse zu schaffen. Es drängt sich nun unwillkürlich die Frage auf, welcher Art denn die bei Einwirkung des Kalialauns auf die Milch entstehende Verbindung ist. Hierauf eine befriedigende Antwort zu geben scheint mir zur Zeit überhaupt unmöglich. So lange die Constitution des Caseins wie der Eiweisskörper überhaupt in tiefes Dunkel gehüllt ist, so lange wir noch nicht einmal wissen, zu welcher Art von chemischen Verbindungen diese zu zählen sind, dürfte die Construction von Phantasieformeln völlig werthlos sein. Gerade bei der hier sich abspielenden Reaction wäre allerdings für derartige Combinationen der weiteste Spielraum gelassen. Hempel¹⁾ hat auf Grund einer der Lehmann'schen Analysen die Formel $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}$ Casein als die passendste herausgerechnet; lässt man auf diese nun $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{K}_2\text{SO}_4 + 24\text{H}_2\text{O}$ einwirken, so ergibt sich ohne Weiteres, dass der denkbaren Verbindungen ungezählte combinirt werden könnten. Wir verzichten aber selbstverständlich hierauf und führen nur die wenigen positiven Thatsachen, die wir über die in Rede stehende Verbindung beigebracht haben, an. Um dieselbe zur weiteren Unter-

¹⁾ Am angef. Orte S. 576.

suchung geeignet zu machen, haben wir, nachdem eine grössere Menge aus Ziegenmilch ausgefallen war, gründlich mit warmem Wasser ausgewaschen, bis das Filtrat weder eine Chlorbaryum noch eine Silbernitratlösung auch nur andeutungsweise trübte und bis dasselbe mit Ammoniak keinen sichtbaren Niederschlag gab. Nunmehr wurde noch 2 mal mit Aether und 2 mal mit absolutem Alkohol nachgewaschen und das Fett im Soxhlet-Apparat extrahirt. Nach Trocknen im Dampfkasten und über H_2SO_4 bis zur Gewichtsconstanz wurde eine Probe verascht, die andere nach Kjeldahl verbrannt.

0,35975 gr. Substanz geben nach Kjeldahl 47,32 mgr. N, entsprechend 298,116 mgr. Ziegencasein; in %: 83,12.

0,39875 gr. Substanz geben nach mehrstündigem Glühen 0,03200 gr. = 8,05 % einer weissen, indifferent schmeckenden Asche. Von derselben ist weder in Wasser noch in Natronlauge noch in Salzsäure etwas löslich.

Weitere Untersuchungen habe ich bei der geringen Aussicht, auf diesem Wege zu einer Erkenntniss über die Natur der vorliegenden Verbindung zu kommen, zunächst nicht angestellt.

Es bleibt mir noch übrig, einige Worte über den praktischen Werth, den die Möglichkeit, die Eiweissstoffe der Milch rasch und sicher quantitativ scheiden zu können, für die Säuglingsernährung selbst hat, hinzuzufügen. So Manchem mag der Nutzen derartiger Untersuchungen problematisch erscheinen und Andere erklären sie direct für überflüssig: so bezeichnet zum Beispiel Bruñner¹⁾ den Nachtheil bei einer von ihm angegebenen Methode, dass man die eiweissartigen Bestandtheile der Milch zusammen, nicht aber Casein und Albumin jedes für sich bestimmen kann, als gering. Und ganz neuerdings meint ein anderer Autor, Johannessen²⁾, dass, wenn es sich darum handelt, das Verhältniss der Milch zur Ernährung zu untersuchen, es überflüssig wäre, zwischen dem Albumin und dem Casein zu differenziren. Ich halte diese An-

¹⁾ Ueber die Zusammensetzung der Frauenmilch. Pflüger's Archiv, Bd. VII, S. 440.

²⁾ Studien zur Sécretionsphysiologie der Frauenmilch. Jahrbuch für Kinderheilkunde, Bd. XXXIX, S. 383.

sicht, die weit verbreitet ist, für einen ganz verhängnisvollen Irrthum; sie hat dazu geführt, immer und immer wieder bei der künstlichen Säuglingsernährung den Schwerpunkt auf den Caseingehalt zu legen, den vielleicht wichtigeren N-Träger, das Albumin, völlig zu ignoriren. Meiner Ansicht nach besteht einer der fundamentalen Unterschiede zwischen der Ernährung an der Mutterbrust und der der Flaschenkinder darin, dass bei ersterer dem Säugling täglich ein ganz beträchtlicher Theil ($\frac{5}{17}$) des von ihm benöthigten N in einer überaus leicht löslichen und resorbirbaren Form einverleibt werden. Erhält doch das Brustkind pro Tag (ich nehme als Beispiel ein $2\frac{1}{2}$ monatliches Kind) mit 1105 gr. Muttermilch über 5 gr. Albumin, ein gleichaltriges Flaschenkind aber so gut wie gar nichts, denn die 1,8 gr. Albumin, die in den etwa 600 gr. Kuhmilch, die consumirt werden, darin sind, werden durch die Siedehitze beim Kochen resp. Sterilisiren ihrer Leichtlöslichkeit beraubt. Ich begeben mich übrigens bei der Werthschätzung des Albumines für die Ernährung durchaus nicht in das Bereich vager Hypothesen, sondern bleibe völlig auf dem Boden des physiologisch längst Feststehenden. Man braucht sich nur zu vergegenwärtigen, welchen complicirten Process das Casein durchzumachen hat, ehe es geeignet wird, das mächtige N-Bedürfniss des rapid wachsenden Säuglings zu befriedigen. Da muss es zunächst im Magen durch Säure ausgefällt werden, durch die Pepsinwirkung die Verdauung begonnen werden, die aber erst im Darm, nach Wiedereintritt der alkalischen Reaction unter Einwirkung des Pancreassaftes, rascher vorwärts gefördert wird. Ganz anders dagegen verhält sich das gelöste Albumin; bei diesem liegt gar kein Grund zu weiteren chemischen Verwandlungen vor; dasselbe ist ja gelöst, was eben bei anderen Eiweisskörpern erst durch die Peptonisirung erreicht wird. Und dass seröse Flüssigkeiten ohne Weiteres resorbirt werden können, ist ja eine aus der Pathologie ganz geläufige Thatsache. Ist dies nun aber durch die Lymphbahnen der Pleura, Kniesynovialis u. s. w. möglich, um wieviel leichter alsdann im Dauungsschlauch, der

durch seinen ganzen Bau zur Resorption prädestinirt ist. In der That liegen directe experimentelle Beweise dafür vor, dass Albuminlösungen ohne jede Veränderung im Digestionstractus direct aufgesaugt werden können (Eichhorst¹⁾, Brücke²⁾. Für die rasche Resorption des Serumalbumins spricht auch die von Frerichs³⁾ erwähnte Thatsache, dass bei Fütterung mit Milch das Serum in einer halben Stunde aus dem Magen entfernt ist, auch wenn der Pylorus unterbunden war. Bedarf nun das Serumalbumin, da ja an und für sich schon löslich, gar nicht erst der Ueberführung in Pepton, so erklärt sich allein hieraus die gewisse Widerstandsfähigkeit, die dasselbe peptonisirenden Einflüssen gegenüber hat. Lässt man, wie Schmidt-Mülheim⁴⁾ und auch Uffelmann⁵⁾ gezeigt haben, Milch leicht angesäuert oder nur bei Körpertemperatur stehen, so bildet sich Pepton, aber ausschliesslich auf Kosten des Caseins; das Serumalbumin erleidet keine Verminderung. Einen noch deutlicheren Hinweis auf die grosse Bedeutung die das Serumalbumin als leichtest resorbirbares Eiweiss hat, bietet sein Vorkommen und Vorwiegen im Colostrum. Warum enthält die Milch der Kuh, die später doch fast ausschliesslich Casein aufzuweisen hat, anfänglich so viel Albumin? Auch hierauf weiss uns die Biologie eine klare Antwort zu geben; einfach deshalb, weil dem neugeborenen Säugethiere in den ersten Tagen die Fähigkeit, Pepsin zu bilden, völlig fehlt (Wolffhügel⁶⁾, Hammarsten⁷⁾, Zweifel⁸⁾;

¹⁾ Ueber die Resorption der Albuminate im Dickdarm. Pflüger's Archiv, Bd. V, S. 570.

²⁾ Sitzungsberichte der math.-nat. Cl. der Ac. der W., Bd. XXXVII, 1859, und Bd. LIX, 1869.

³⁾ Handwörterbuch der Physiol., Bd. III, 1, S. 826.

⁴⁾ Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper der Milch. Pflüger's Archiv, Bd. XXVIII, S. 243.

⁵⁾ Studien über die Verdauung der Kuhmilch. Pflüger's Archiv, Bd. XXIX, S. 339.

⁶⁾ Ueber die Magenschleimhaut neugeborener Säugethiere. Zeitschrift für Biol., Bd. XI, S. 217.

⁷⁾ Beiträge zur Anat. und Physiol., 1875, Bd. LXVI, Heft 1.

⁸⁾ Untersuchungen über den Verdauungsapparat Neugeborener. Berlin 1874, S. 20.

das neugeborene Kind hat jedoch, wenn auch in wenig intensivem Grade, die Fähigkeit, zu peptonisiren, daher kann die Frauenmilch schon von vornherein etwas Casein enthalten. Bald freilich ändert sich die Sachlage, das Säugethier entwickelt sich ungleich rascher und hat in kurzer Zeit einen ausgebildeten Labmagen, der vorzüglich zur Verarbeitung auch grosser Caseinmengen geeignet ist; das Kind jedoch hat bis zum Beginne des 2. Lebenshalbjahres einen ganz beträchtlichen Mangel an Drüsen im Digestionsapparat — hier ist es daher geboten, einen Eiweissstoff einzuführen, der geringe Anforderungen an die Drüsenelemente stellt und ihrer zur Erreichung einer für die Resorption geeigneten Umwandlung nicht bedarf.

Weiteres gehört nicht hierher — sollte doch nur betont werden, welche Bedeutung das Albumin für die Säuglingsernährung hat und wie dringend erwünscht es ist, dass diese Verhältnisse eine weitere Klärung erfahren. Den Weg hierzu weist uns die Natur selbst, — folgen wir ihr, und wir werden nicht fehlgehen.

Ich erfülle zum Schluss eine angenehme Pflicht, indem ich dem Vorstand des Laboratoriums für organische Chemie an der Kgl. Technischen Hochschule zu Dresden, Herrn Prof. von Meyer, meinen verbindlichsten Dank für die mir in seinem Laboratorium gewährte Aufnahme, sowie für das lebhafteste Interesse und die vielseitige Förderung, die derselbe meinen Arbeiten hat zu Theil werden lassen, ausspreche.
