

Untersuchungen über die Proteinstoffe.

II. Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen und Peptonen.

Von

Dr. Ernst P. Pick aus Jaroměř (Böhmen).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 4).

(Der Redaction zugegangen am 16. Oktober 1897.)

Die neueren Untersuchungen über Spaltung der Eiweisskörper haben mit zunehmender Klarheit zu der Erkenntniss geführt, dass ein Einblick in den Bau des Eiweissmoleküls von der Kenntniss der letzten Spaltungsprodukte allein nicht zu erwarten steht, dass vielmehr dazu ein genaueres Studium der beim Abbau auftretenden Zwischenprodukte, der als Albumosen und Peptone bezeichneten Körper, erforderlich ist. Die wichtigsten Arbeiten in letzterer Richtung verdanken wir Kühne¹⁾

1) Kühne und Chittenden, Ueber die nächsten Spaltungsprodukte der Eiweisskörper. Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. 1, 1883, S. 159.

Dieselben, Ueber Albumosen. Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. 2, 1884, S. 11.

Dieselben, Ueber Peptone. Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. 4, 1886, S. 423.

Kühne, Erfahrungen über Albumosen und Peptone. Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. 11, 1892, S. 1.

und seinen Schülern Chittenden und Neumeister,¹⁾ welche vorzugsweise als spaltendes Agens die im Uebrigen chemisch nicht eingreifend wirkenden Verdauungsfermente benutzten. In Uebereinstimmung mit anderwärts beim Abbau der Eiweisskörper, z. B. durch Säure und Alkali, Wasser von mehr als 100°, gemachten Erfahrungen stellte sich dabei heraus, dass die zunächst entstehenden Produkte sich von der Muttersubstanz nicht durch Reactionen unterscheiden, welche auf eine Verschiedenheit der Constitution hinweisen, sondern durch Aenderungen des molekular-chemischen Verhaltens, so der Coagulirbarkeit, der Fällbarkeit durch Wasser entziehende Stoffe, der Diffusibilität, Aenderungen, welche wohl allgemein als Folge einer Verkleinerung des Moleküls aufgefasst werden. So entstehen bei peptischer Verdauung der wahren Eiweisskörper zunächst die nicht mehr durch Erhitzen coagulirbaren, aber noch durch Sättigung mit Kochsalz oder Magnesiumsulfat fällbaren primären Albumosen, sodann die durch Kochsalz nur bei Anwesenheit von Säure oder besser durch Ammonsulfat fällbaren secundären Albumosen, endlich die durch Salzsättigung überhaupt nicht mehr abscheidbaren «echten Peptone».²⁾

Von diesen drei Fractionen kann die erste durch Diffusion weiter zerlegt werden in Proto- und Heteroalbumose. Für die secundären Albumosen und «echten» Peptone, soweit sie durch Pepsinverdauung entstehen, wird zwar mit Vorliebe die Annahme gemacht, dass es sich nicht um einheitliche Substanzen,

1) Neumeister, Zur Kenntniss der Albumosen. Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. 5, 1887, S. 381.

Derselbe, Ueber Reactionen der Albumosen und Peptone. Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. 8, 1890, S. 324.

Derselbe, Bemerkungen zur Chemie der Albumosen und Peptone. Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. 6, S. 267.

Derselbe, Lehrbuch der physiolog. Chemie. II. Auflage, 1897, Jena (Gust. Fischer); daselbst S. 228 auch die ältere Litteratur.

2) Bekanntlich haben Lehmann, Brücke und andere Untersucher vor Kühne die Gesammtheit der Verdauungsprodukte, also Albumosen und «echte» Peptone, unter dem Namen Peptone zusammengefasst, ein Sprachgebrauch, der noch sehr verbreitet ist.

sondern um Gemenge ähnlicher, aber nicht identischer Körper handelt, allein diese Annahme stützt sich vorwiegend auf das Hervorgehen aus zwei primären Albumosen und auf ein ungleiches Verhalten dem Trypsin gegenüber. Eine Isolirung der einzelnen Bestandtheile gelang nicht. Das jüngst von S. Fränkel¹⁾ zur Isolirung der Deuteroalbumose mit Hilfe von Kupfersulfat und Ferrocyanbaryum angegebene Verfahren gestattet wohl eine Scheidung der primären von den secundären Albumosen, gibt aber für die Trennung der letzteren keine Anhaltspunkte.²⁾ Der Versuch H. Schrötter's,³⁾ aus dem käuflichen Witte-Pepton durch Benzoylirung gut charakterisirte Derivate zu erhalten, hat zwar die Verwendbarkeit des Verfahrens sicher gestellt, allein trotz sehr beachtenswerther methodischer Ansätze keinen Aufschluss über die Natur der benzoylirten Stoffe gebracht.

Dieser Sachlage gegenüber erschien es nicht aussichtslos, neuerlich die fractionirte Trennung der im Verdauungsgemisch auftretenden Albumosen und Peptone zu versuchen, zumal hierzu ein für diesen Zweck nicht geprüftes Verfahren zur Verfügung stand, das sich auf verwandtem Gebiete, bei der Trennung von echten Eiweisskörpern, gut bewährt hatte: die fractionirte Fällung mit Ammonsulfatlösung. Der Vortheil des von Hofmeister und seinen Schülern Kauder,⁴⁾ Pohl,⁵⁾ Lewith⁶⁾ und

1) Dr. S. Fränkel, Ueber die Spaltungsprodukte des Eiweisses bei der Verdauung. I. Mittheilung. Ueber eine neue Methode der Darstellung der Deuteroalbumose.

Sitzungsberichte der k. Akademie der Wissenschaften in Wien. Math.-naturw. Classe. C VI, Abth. IIb, Juli 1897.

2) Fränkel spricht consequenterweise von der Deuteroalbumose in der Einzahl.

3) H. Schrötter, Beiträge zur Kenntniss der Albumosen. Monatshefte für Chemie, Bd. 14, 1893, S. 612.

4) G. Kauder, Zur Kenntniss der Eiweisskörper des Blutserums. Archiv für experim. Patholog. und Pharmak., Bd. 20, S. 411.

5) Pohl, Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten. Archiv für experim. Patholog. und Pharmak., Bd. 20, S. 426.

6) S. Lewith, Zur Lehre von der Wirkung der Salze. I. Mittheilung. Archiv für experim. Patholog. und Pharmak., Bd. 24, S. 1.

Reye¹⁾ mit Erfolg angewendeten Verfahrens liegt, wie schon Kauder hervorhebt, in der Möglichkeit, die Concentrationsgrenzen, innerhalb deren die Abscheidung einer Fraction erfolgt, scharf zu bestimmen, während die Methoden der Salzsättigung zur Voraussetzung haben, dass die Sättigungsconcentration mit jenem Gehalt zusammenfällt, der zur Abscheidung der betreffenden Substanz gerade nothwendig ist, eine Voraussetzung, die in einzelnen Fällen, z. B. bei der Ausfällung von Globulin durch Magnesiumsulfat, zutreffen mag, in der Mehrzahl der Fälle aber, z. B. bei dem Aussalzen der primären Albumosen durch Steinsalz, das stets unvollständig bleibt, im Stiche lässt. Um die Salzconcentrationen genau zu bestimmen, bei denen die Abscheidung einzelner Fractionen erfolgt, steigert man durch Zufuhr von Ammonsulfat den Salzgehalt bis zum Beginn einer Trübung (untere Fällungsgrenze der I. Fraction), geht sodann mit dem Salzzusatz weiter, bis das Filtrat von dem entstandenen Niederschlag bei weiterem geringen Salzzusatz keine Fällung mehr gibt (obere Fällungsgrenze der I. Fraction). Bei weiterer Erhöhung des Salzgehaltes tritt zunächst keine weitere Veränderung ein (Intervall zwischen den Fällungsgrenzen), dann aber erfolgt von einem bestimmten Punkte ab Trübung (untere Fällungsgrenze der II. Fraction); nach vollständiger Ausfällung lässt sich neuerlich eine obere Fällungsgrenze (der II. Fraction) sicherstellen, es folgt neuerlich ein Intervall, dann wird die Fällungsgrenze der III. Fraction erreicht u. s. f. bis zur völligen Sättigung mit Salz. Natürlich lässt sich eine solche quantitative Bestimmung nicht an einer Probe durchführen, sondern erfordert mehrere Versuchsreihen, wie sie z. B. von Kauder und Lewith ausführlich mitgetheilt worden sind. Ueberdies muss, wenn die gefundenen Zahlen auf allgemeine Gültigkeit Anspruch erheben sollen, auf die Reaction der Flüssigkeit geachtet werden, weil bekannt ist, dass Aenderung derselben, z. B. Ueberführung von alkalischer in saure, die Fällungsgrenzen sehr wesentlich verschieben kann

1) Quantitative Bestimmung des Fibrinogens. Noch nicht publicirte Untersuchungen.

(z. B. beim Albumin). Ebenso verdient die Concentration der Ausgangslösung besondere Rücksicht, da, wie ebenfalls für Eiweisslösungen festgestellt ist, hohe Concentrationen an dem zu fällenden Körper die Fällungsgrenzen herabdrücken.

Als Material für meine Versuche diente das sogenannte Witte'sche Pepton. Da meine Untersuchungen nicht auf die Untersuchung der Spaltungsprodukte eines bestimmten reinen Eiweisskörpers, sondern auf die Anbahnung eines methodischen Fortschrittes gerichtet waren, war die Wahl eines bequem in beliebiger Menge zugänglichen Ausgangsmaterials von annähernd gleichförmiger Beschaffenheit angezeigt. Dieser Forderung entsprach das genannte Präparat, welches überdies den Vortheil darbietet, besser als andere, ähnliche Handelspräparate bekannt zu sein, da es bei der Feststellung der Eigenschaften der Albumosen und Peptone des Fibrins direkt Verwendung gefunden hat. Allerdings darf der Umstand nicht ausser Acht gelassen werden, dass seine Muttersubstanz, das Blutfibrin, nicht als reiner Eiweisskörper angesehen werden kann, ferner, dass das käufliche Peptonpräparat einen merklichen Salzgehalt aufweist.

Die Herstellung der Lösungen geschah durch Uebergiessen mit heissem Wasser. Gewöhnlich löste sich das Pepton nach einigem Stehen auch ohne Umrühren leicht auf, die trübe Flüssigkeit wurde abkühlen gelassen und von dem abgesetzten, feinflockigen Bodensatze abfiltrirt. Dem klaren, alkalisch reagirenden Filtrate ertheilte ich die gewünschte Reaction und filtrirte von der eventuell entstandenen Trübung nochmals ab. Zur Herstellung genau neutraler Lösungen wurde tropfenweise mit verdünnter Salzsäure neutralisirt. Alkalische Reaction wurde so gewählt, dass je 100 ccm. des Filtrats 4 ccm. einer mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnten Ammoniaklösung vom specifischen Gewicht 0,925 enthielten. Saure Reaction wurde durch Zusatz eines bestimmten Volumens ammoniumsulfatgesättigter Schwefelsäure, von der 10 ccm. im Stande waren, 17 ccm. einer $\frac{1}{10}$ N Natronlauge zu neutralisiren, zur genau neutralisirten Flüssigkeit erzielt, dementsprechend aber der Zusatz neutraler Ammonsulfatlösung herabgemindert. Die Lösungen wurden in mit Wattepfropf gut verschlossenen Kolben gehalten und liessen sich so, ohne zu schimmeln, eine Zeit lang aufbewahren.

Als Fällungsmittel diente eine kaltgesättigte Ammonsulfatlösung, deren wiederholt vorgenommene densimetrische Bestimmung ein wohl von der Zimmertemperatur abhängiges Schwanken des specifischen Gewichtes zwischen 1253—1255 ergab.

Die Versuchsanordnung war wie bei Kauder, Pohl, Lewith derart gewählt, dass mittelst Büretten allemal ein bestimmtes Volumen der «Peptonlösung» mit einer gleichmässig zunehmenden Menge des gesättigten Salzes gefällt und mit destillirtem Wasser auf das Gesamtvolumen von 10 ccm. ergänzt wurde. Die dabei eingehaltene Reihenfolge war: «Peptonlösung,» Wasser und Ammonsulfat; bei saueren Lösungen wurde die salzgesättigte Säure erst zu der mit Wasser entsprechend verdünnten «Wittelösung» hinzugefügt und dann der sich ergebende Rest Ammonsulfat zugesetzt. Die Concentration, bei der die erste bleibende Trübung eintrat, wurde als untere Fällungsgrenze verzeichnet. Die Proben wurden, nachdem das Salz durch Hin- und Herfliessenlassen in der Eprouvette gleichmässig vertheilt worden war, gewöhnlich ungefähr $\frac{1}{2}$ Stunde stehen gelassen und dann durch ein doppeltes Papierfilter filtrirt. Oft genügte $\frac{1}{2}$ Stunde nicht zum vollständigen Ausfällen und es mussten die Proben durch mehrere Stunden — bis zu 24 Stunden — stehen, bevor sie auf das Filter gebracht werden konnten. Das klare Filtrat wurde dann in den einzelnen Fractionen angepasster Weise auf einen etwa noch nicht ausgefallten Rest der Fraction geprüft: es geschah dies in der Regel mit 0,2—0,4 ccm. gesättigter Ammonsulfatlösung, unter bestimmten, unten näher angegebenen Verhältnissen, mit 0,2—0,4 ccm. salzgesättigter Säure oder endlich durch Sättigung mit gepulvertem Ammonsulfat. Dabei zeigte das zuerst vollständig klar gebliebene Filtrat die beendigte Ausfällung — die obere Fällungsgrenze der Fraction — an. Die so ermittelten Fällungsgrenzen gestatteten nun in einer frischen Peptonlösung die Abscheidung der betreffenden Fraction durch einen bekannten Salzzusatz; das Filtrat wurde dann in gleicher Weise auf die nächst schwerer fällbare Fraction verarbeitet. Naturgemäss musste sich dabei mit der fortschreitenden Ausfällung einerseits die Concentration der «Witte-Peptonlösung» vermindern, andererseits der Salzgehalt, den die Filtrate durch die jeweilige vorherige Ausfällung erworben hatten, vergrössern. Um die Concentration an Pepton möglichst vergleichbar zu gestalten, wurde, wo dies anging, die Peptonlösung in der Concentration und Menge genommen, dass sie der in der ersten Versuchsreihe angewendeten 5% «Peptonmenge» von 2 ccm. entsprach; in ähnlicher Weise musste auch auf den Ammonsulfatgehalt der Lösungen Bedacht genommen werden.

Der Einfluss der Concentration der Peptonlösung wurde durch vergleichende Versuche mit 5%, 10%, 15% und 20% Lösungen ermittelt.

Die beigegebenen Tabellen dürften im Zusammenhange mit dem Gesagten über die Versuchsanordnung ausreichend orientiren.

I. Vorgehen bei der Fractionirung.

A. Bestimmung der Fällungsgrenzen in 5% neutraler Lösung.

Versuchsreihe I.

5% Pepton- lösung. ccm.	Wasser. ccm.	Salz. ccm.	Salzfällung.	Verhalten des Filtrats mit 0,2 ccm. Ammonsulfat.	Bemerkung.
2	7	1	keine Trübung	—	} Unt. Fällungs- grenze der Fraction I.
2	6	2	»	—	
2	5,8	2,2	»	—	
2	5,6	2,4	»	—	
2	5,4	2,6	leichte Opalescenz	—	
2	5,2	2,8	stärkere Opalescenz	—	
2	5	3	deutliche Trübung	starke Trübung	
2	4,8	3,2	Trübung	schwächere Trübung (beim Stehen deutlicher)	
2	4,6	3,4	»	schwache Trübung	
2	4,4	3,6	»	»	
2	4,2	3,8	»	Opalescenz	} Ob. Fällungs- grenze der Fraction I.
2	4	4	Fällung	schwache Opalescenz	
2	3,8	4,2	»	sehr schwache Opalesc.	
2	3,6	4,4	»	klar	
2	3,4	4,6	»	» nach 1/2stündig.	
2	3,2	4,8	»	» Stehen treten	
2	3	5	»	» leichte Nach- trübungen anf.	
2	2,8	5,2	»	»	
2	2,6	5,4	»	» innerhalb	
2	2,4	5,6	»	» 24 Stunden auf- tretende zarte	
2	2,2	5,8	»	» Nachtrübungen.	
2	2	6	»	» von da ab	
2	1,8	6,2	»	» keine Nach- trübung mehr.	

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, dass bei einem Ammonsulfatgehalte von 2,6 ccm. in 10 ccm. Gesamtlösung ein Niederschlag, den wir vorläufig Fraction I nennen, zu fallen beginnt, dessen obere Fällungsgrenze bei einem Salzgehalte von 4,4 ccm. liegt. Es findet sich hier eine auffällige Analogie mit den von Kauder im Rinderblutserum gefundenen Fällungsgrenzen des Globulins (2,7—4,4 ccm.). Behufs Untersuchung der weiteren Fractionen wurde die Fraction I in Analogie mit der Globulinfällung durch Zusatz des gleichen Volumens kalt-

gesättigter Ammonsulfatlösung abgeschieden, um so mehr, als die untere Fällungsgrenze der folgenden Substanz kein Hinderniss dafür bot.

Die nach einiger Zeit allmählich auftretenden schwachen Opalescenzen sollen später eine Besprechung erfahren.

Versuchsreihe II.

Aus einer neutralen 5% Witte-Peptonlösung wird die Fraction I mit dem gleichen Volumen kaltgesättigter Ammonsulfatlösung ausgefällt und das nach 1/2 stündigem Stehen gewonnene halbgesättigte Filtrat folgendermaassen geprüft:

Halbgesättigt. Filtrat. ccm.	Wasser. ccm.	Salz. ccm.	Salzfällung.	Verhalten der Filtrats mit 0,2 ccm. Ammonsulfat.	Bemerkung.
4 (2 ¹)	3	3 (5) ²	keine Trübung	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction II.
4 (2)	2,8	3,2 (5,2)	»	—	
4 (2)	2,6	3,4 (5,4)	Spur Opalescenz	—	
4 (2)	2,4	3,6 (5,6)	Opalescenz	—	
4 (2)	2,2	3,8 (5,8)	starke Opalescenz	—	
4 (2)	2	4 (6)	Trübung	schwache Trübung	Ob. Fällungsgrenze der Fraction II.
4 (2)	1,8	4,2 (6,2)	»	keine Trübung	
4 (2)	1,6	4,4 (6,4)	»	»	
4 (2)	1,4	4,6 (6,6)	»	»	

Die ermittelten Fällungsgrenzen der Fraction II reichen von 5,4—6,2 ccm.; es ist daher eine 2/3 gesättigte Lösung, welche etwa dem Verhältnisse 6,6 ccm. Ammonsulfatgehalt zu 10 ccm. Gesamtlösung entspricht, mehr als hinreichend, die Fraction II auszuschneiden.

Versuchsreihe III.

Nachdem in der eben angegebenen Weise, also mit dem doppelten Volumen kaltgesättigter Salzlösung, die beiden ersten

1) Die in Klammern beigegebene Zahl zeigt die der ursprünglichen Witte-Peptonlösung entsprechende Menge an.

2) Die zweite Zahl gibt den Gesamtsalzgehalt an, wie er sich aus dem Salzzusatz mehr dem Salzgehalt des halbgesättigten Filtrates ergibt.

Fractionen zur Ausscheidung gelangt waren, wurde mit dem Filtrate die folgende Reihe aufgestellt:

$\frac{2}{3}$ gesättigt. Filtrat. ccm.	Wasser. ccm.	Salz. ccm.	Salzfällung.	Verhalten des Filtrats gegen Sättigung mit gepulvertem Ammonsulfat.	Bemerkung.
6 (2)	3	1 (5)	keine Trübung	—	Unt. Fällungs- grenze der Fraction III.
6 (2)	2	2 (6)	»	—	
6 (2)	1	3 (7)	nach einigem Stehen schwach opal.?	—	
6 (2)	0,8	3,2 (7,2)	schwache Opalesc.	Trübung	
6 (2)	0,6	3,4 (7,4)	starke Opalescenz	»	
6 (2)	0,4	3,6 (7,6)	stärkere Opalescenz	»	
6 (2)	0,2	3,8 (7,8)	Trübung	»	Ob. Fällungs- grenze der Fraction III.
6 (2)	—	4 (8)	»	schwache Trübung	
3 (1)	—	7 (9)	»	zunächst klar, nach einiger Zeit leicht getrübt	
1,5 (0,5)	—	8,5 (9,5)	»	dauernd klar	

Einem eventuellen Einwande, dass nämlich die beiden letzten Proben nur relativ sehr geringe Mengen der ursprünglichen Witte-Peptonlösung enthielten, schwache Trübungen daher der Beobachtung hätten entgehen können, wurde durch folgenden Versuch begegnet: 17,8 gr. trockenes Präparat wurde direkt in 60 ccm. $\frac{2}{3}$ gesättigter Ammonsulfatlösung vertheilt und mit dem in Lösung gegangenen, nunmehr stark concentrirten Theil die obere Fällungsgrenze, wie früher, bestimmt. Es ergab sich das gleiche Resultat. Es folgt daraus, dass die Sättigung einer neutralen Witte-Peptonlösung mit festem Ammonsulfat die Fraction III vollkommen auszuschneiden vermag, ja, dass selbst eine etwas unter dem Sättigungspunkte stehende Concentration genügt.

Versuchsreihe IV.

Kühne's und Neumeister's Untersuchungen lehren, dass Ammonsulfatsättigung in neutraler Lösung kein albumose-freies Filtrat zu erzeugen vermag. Wir bedienten uns nunmehr neben Ammonsulfat der schon früher erwähnten ammon-sulfatgesättigten Schwefelsäure¹⁾ als Fällungsmittel, indem wir

1) Eine $\frac{1}{10}$ N Schwefelsäure wurde heiss mit Ammonsulfat gesättigt, erkalten gelassen und auf $\frac{1}{10}$ N Natronlauge gestellt; 10 ccm. der gesättigten Säure entsprachen 17 ccm. $\frac{1}{10}$ N Natronlauge.

dem salzgesättigten Filtrat die Säure in den nachfolgenden Verhältnissen hinzusetzen.

a)

Salz- gesättigtes Filtrat. ccm.	Salz- gesättigte Säure. ccm.	Salz- und Säurefällung.	Filtrat mit 0,2–0,5 ccm. salzgesättigter Säure geprüft.
2	1 Tropfen	schwach opal.	starke Trübung
2	0,1	Trübung	schwache Trübung
2	0,2	starke Trübung	klar
2	0,5	Trübung	„
2	0,8	„	„
2	1	„	„
2	1,5	schwache Trübung	„
2	1,8	sehr schwach opal.	„
2	2	„	„
2	3	„	„
2	4	„	„
2	5	„	„
2	6	klar	—
2	7	„	—
2	8	„	—

b)

Salz- gesättigtes Filtrat. ccm.	Salz- gesättigte Säure. ccm.	Salz- und Säurefällung.	Filtrat mit 0,2–0,5 ccm. salzgesättigter Säure geprüft.
9	0,2	schwach opal.	stark trüb
9	0,5	Trübung	„
9	0,6	„	erst schwache, später stärkere Trübung
9	0,7	„	Spur Trübung
9	0,8	starke Trübung	klar
9	0,9	„	„
9	2,5	„	„
9	4,5	schwache Trübung	„
9	5	Opalescenz	„

c)

Salzge- sättigt. Filtrat. ccm.	Salzge- sättigt. Säure. ccm.	Salz- und Säurefällung.	Salzge- sättigt. Filtrat. ccm.	Salzge- sättigt. Säure. ccm.	Salz- und Säurefällung.
1	0,2	Trübung	6	0,2	starke Opalescenz
2	0,2	„	7	0,2	schwache Opalescenz
3	0,2	„	8	0,2	„
4	0,2	„	9	0,2	„
5	0,2	starke Opalescenz			

Die Versuchsreihen a) und b) lassen für die Ausscheidung der Fraction IV ein bestimmtes Verhältniss zwischen der Filtratmenge und der zugesetzten Säuremenge nothwendig erscheinen; die Ausfällung war am vollständigsten dann, wenn die zugefügte Säure ungefähr $\frac{1}{10}$ Volumen der Filtratmenge betrug oder nicht viel darüber. War dieses Verhältniss nach oben oder nach unten zu (Tabelle c) bedeutend überschritten, so war eine völlige Ausscheidung nicht zu erzielen.

Aus anderweitigen Versuchen ging auch hervor, dass Reste der Fraction erst nach längerem Stehen ausfallen und sich daher 24 stündiges Stehenlassen der Proben empfiehlt.

Um zu entscheiden, ob dieses Verfahren thatsächlich geeignet ist, auch die letzten Albumosenreste mit auszufällen, wurden 50 ccm. des salzgesättigten Filtrats mit 5 ccm. obiger salzgesättigten Schwefelsäure gefällt, die stark milchige Trübung nach 24 Stunden abfiltrirt, das Filtrat neutralisirt, eingengt und mit $\frac{1}{10}$ Volumen der salzgesättigten Schwefelsäure versetzt; die Flüssigkeit blieb klar. Eine zweite in gleicher Weise ausgeführte Probe ergab dasselbe Resultat. Es dürfte damit eine möglichst vollkommene Ausfällung der Albumosen gewährleistet sein.

Das Verhalten der Fraction IV gegen Säurezusatz könnte wohl geeignet sein, eine Aufklärung für den Befund Kühne's zu geben, dass nämlich das saure, salzgesättigte Filtrat neben Pepton noch Albumosenreste enthalte, und eine Vereinfachung

der auf diesem Befunde basirenden Methode der Aussalzung in neutraler, ammoniakalischer und saurer Lösung gestatten.

Die nun folgende Versuchsreihe gibt die Fällungsgrenzen dieser in saurer Lösung ausgeschiedenen Fraction IV wieder:

Versuchsreihe V.

Salz-gesättigtes Filtrat. ccm.	Wasser. ccm.	Salz-gesättigte Schwefelsäure. ccm.	Gesättigte Ammonsulfatlösung. ccm.	Salz- und Säurefällung.	Filtrat mit Ammonsulfatpulver gesättigt und mit 0,2 ccm. gesättigter Schwefelsäure geprüft.	Bemerkung.
8	1,1	0,9	— (8,9) ¹⁾	} erst nach 24 stündigem Stehen eine geringe feinflockige Ausscheidung.	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction IV.
8	0,9	0,9	0,2 (9,1)		—	
8	0,7	0,9	0,4 (9,3)	sehr schwach opal.	Opalescenz	
8	0,5	0,9	0,6 (9,5)	schwach opal.	schwache Trübng.	
8	0,3	0,9	0,8 (9,7)	stark opal.	Spur Trübung	
8	0,1	0,9	1 (9,9)	»	fast klar	

Es zeigen diese Versuche, dass eine Verdünnung von 10 ccm. gesättigter, saurer Lösung mit 0,1 ccm. Wasser die beinahe vollständige Fällung der der Fraction IV entsprechenden Albumose nicht beeinträchtigt, andererseits liefern sie einen auf anderem Wege erbrachten Beweis für die Richtigkeit des oben gefundenen Säurezusatzes.

B. Bestimmung der Fällungsgrenzen in 5% alkalischer Lösung. Die in gleicher Weise wie bei neutraler Reaction vorgenommenen Untersuchungen mögen hier nur kurz Erwähnung finden, da die gefundenen Fällungsgrenzen nur eine geringe Abweichung von denen der neutralen Lösungen bieten und keineswegs ein bedeutendes Hinausschieben der Sättigungs-

1) Entspricht der Gesamtsalzmenge.

punkte, wie ich anzunehmen geneigt war, darstellen. Wohl aber glaube ich, eine zeitliche Verzögerung der Ausfällung bemerkt zu haben, weshalb vor dem Abfiltriren der einzelnen Fractionen (besonders der Fraction I und II) ein 24 stündiges Stehenlassen der salzgefällten Lösungen rathsam erscheint. Die Ergebnisse der Versuche sind folgende:

	Fraction I	Fraction II	Fraction III
Untere Fällungsgrenze	2,4	5,8	7,4
Obere Fällungsgrenze	4,4	6,2	9,5

C. Bestimmung der Fällungsgrenzen in 5% saurer Lösung. Wie früher mitgetheilt worden war, wurde die saure Reaction stets in den erst neutralisirten Flüssigkeiten hergestellt; eine Ausnahme macht die erste der nun folgenden Versuchsreihen, bei welcher die ursprüngliche schwach alkalische Reaction vor dem Ansäuern beibehalten blieb. Wir bedienten uns dabei des bei der Isolirung der Fraction IV gefundenen Säureoptimums, indem wir mit $\frac{1}{10}$ Volum ansäuerten, so zwar, dass das Gesamtvolumen der Lösung — die Säure mit inbegriffen — 10 ccm. betrug.

Versuchsreihe VI.

Schwach alkal. Peptonlösung. ccm.	Wasser. ccm.	Salz- gesättig. Säure. ccm.	Gesätt. Ammon- sulfat. ccm.	Ammon- sulfat im Ganzen. ccm.	Salz- und Säurefällung.	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Ammonsulfat.	Bemerkung.
2	7,1	0,9	—	0,9	keine Trübung.	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction I.
2	6,9	0,9	0,2	1,1	»	—	
2	6,8	0,9	0,3	1,2	sehr schwache Opalescenz	—	
2	6,6	0,9	0,5	1,4	»	—	
2	6,4	0,9	0,7	1,6	schwach. Opal.	—	
2	6,1	0,9	1	1,9	Opalescenz	—	
2	5,1	0,9	2	2,9	Trübung	Trübung	Ob. Fällungsgrenze der Fraction I.
2	4,1	0,9	3	3,9	»	Opalescenz	
2	3,9	0,9	3,2	4,1	»	Andeutung von Opal.	
2	3,7	0,9	3,4	4,3	»	klar	
2	3,3	0,9	3,8	4,7	»	»	
2	2,9	0,9	4,2	5,1	»	von da ab klar	

Das Fällungsgebiet der Fraction I wird demnach in saurer Lösung erreicht an der unteren Grenze bei einem Ammonsulfatgehalt von 1,2 ccm. auf 10 ccm. Gesamtlösung, an der oberen bei einem Verhältniss von 4,3 ccm.: 10 ccm.

Versuchsreihe VII.

Zu diesen Versuchen fand eine neutrale Lösung Verwendung, aus welcher die Fraction I durch Ausfällen mit dem gleichen Volumen Ammonsulfat entfernt worden war.

Halbgesätt. neutrales Filtrat. ccm.	Wasser. ccm.	Salz- gesättigt. Säure. ccm.	Gesätt. Ammon- sulfat. ccm.	Ammon- sulfat im Ganzen. ccm.	Salz- und Säurefällung.	Filtrat geprüft mit 0,2 ccm. Ammonsulfat.	Bemerkung.
4 (2)	4,1	0,9	1 (3)	3,9	keine Trübg.	—	Unt. Fällungs- grenze der Fraction II.
4 (2)	3,5	0,9	1,6 (3,6)	4,5	»	—	
4 (2)	3,3	0,9	1,8 (3,8)	4,7	sehr schwache Opalescenz	—	
4 (2)	3,1	0,9	2 (4)	4,9	Opalescenz	schwach opal.	
4 (2)	2,7	0,9	2,4 (4,4)	5,3	»	sehr schwach opal.	Ob. Fällungs- grenze der Fraction II.
4 (2)	2,5	0,9	2,6 (4,6)	5,5	»	Andeutung von Opalesc.	
4 (2)	2,3	0,9	2,8 (4,8)	5,7	»	»	
4 (2)	2,1	0,9	3 (5)	5,9	Trübung	klar nach 24 Stunden Nachtrübung	
4 (2)	1,9	0,9	3,2 (5,2)	6,1	»	»	
4 (2)	1,7	0,9	3,4 (5,4)	6,3	»	»	
4 (2)	1,5	0,9	3,6 (5,6)	6,5	»	»	
4 (2)	1,3	0,9	3,8 (5,8)	6,7	»	»	
4 (2)	1,1	0,9	4 (6)	6,9	»	»	
4 (2)	0,1	0,9	5 (7)	7,9	»	»	

Es ergeben sich hieraus folgende Verhältnisszahlen der Ammonsulfatsättigung: 4,7 ccm. Ammonsulfat: 10 ccm. für die untere und 5,9 ccm. Ammonsulfat: 10 ccm. für die obere Grenze.

Versuchsreihe VIII.

Eine neutrale 5% Witte-Peptonlösung wurde mit dem doppelten Volumen kalt gesättigten Ammonsulfats versetzt und das Filtrat der also von der Fraction I und II befreiten Lösung nachfolgend verarbeitet:

$\frac{2}{3}$ gesättigt. neutr. Filtrat. ccm.	Wasser. ccm.	Salz- gesättigte Schwefel- säure. ccm.	Gesätt. Ammon- sulfat. ccm.	Ammon- sulfat im Ganzen. ccm.	Salz- und Säurefällung.	Filtrat geprüft mit 0,4 ccm. gesättigt Ammonsulfat.	Bemerkung.
6 (2)	3,1	0,9	— (4)	4,9	keine Trübg.	—	
6 (2)	2,1	0,9	1 (5)	5,9	»	—	
6 (2)	1,9	0,9	1,2 (5,2)	6,1	»	—	Unt. Fällungs- grenze der Fraction III.
6 (2)	1,7	0,9	1,4 (5,4)	6,3	Andeutung von Opalesc.	—	
6 (2)	1,5	0,9	1,6 (5,6)	6,5	Opalescenz	opal.	
6 (2)	1,1	0,9	2 (6)	6,9	Trübung	opalescent	
6 (2)	0,9	0,9	2,2 (6,2)	7,1	»	Spur opal.	
6 (2)	0,7	0,9	2,4 (6,4)	7,3	starke Trübg.	»	
6 (2)	0,5	0,9	2,6 (6,6)	7,5	stärkere Trüb.	»	Ob. Fällungs- grenze der Fraction III.
6 (2)	0,3	0,9	2,8 (6,8)	7,7	»	klar	
6 (2)	0,1	0,9	3 (7)	7,9	»	{ nach 24 Stunden Nachtrübg.	

Eine zweite gleiche Versuchsreihe wurde vor dem Filtriren der einzelnen gefällten Proben ca. 40 Stunden behufs vollständigen Absetzens und Vermeidung von Nachtrübungen stehen gelassen; während die untere Fällungsgrenze der eben gefundenen analoge Verhältnisse ergab (6,3:10), konnte die obere aus dem Verhalten der Filtrate überhaupt nicht ersehen werden, da diese auf Ammonsalzzusatz vollständig klar blieben. Es war nur möglich, als Massstab der beendeten Ausfällung das Maximum der Trübung der unfiltrirten Proben anzusehen. Diese stärkste Trübung war erreicht bei einem Gesamtzusatze von 6,9 ccm. Ammonsulfat und schien von diesem Punkte aus nicht mehr zuzunehmen; bedenkt man aber, wie wenig Unterschied in der Dichte der Trübung die geringen erst bei den folgenden Proben ausgefällten Albumosenreste für das Auge bedeuten, so dürfte man wohl berechtigt sein, die obere hier thatsächlich bestehende Fällungsgrenze in die Nähe der aus der Tabelle ersichtlichen (7,7 ccm.: 10 ccm.) zu rücken. Der Umstand, dass die Filtrate durchwegs klar blieben, obwohl in den ihnen entsprechenden Proben die Trübungen zunahmen, mag seine Erklärung finden in der eigenthümlichen Form der Abscheidung der Fraction III als ölige zusammenfließende Tropfen, welche auf dem Boden des Probirglases haften; die

in den Filtraten enthaltenen geringen Reste bleiben dann bei der hier gegebenen Concentration infolge der geringen Brechungsdifferenz der Medien unsichtbar. Es ist daher die Fraction III in saurer Lösung in einem Verhältniss von 7,7 ccm. Ammonsulfat: 10 ccm. der Gesamtlösung auszufällen.

Die Fällungsgrenzen der Fraction IV, welche nur in saurer Lösung zu isoliren ist, da sie ja nur aus der ammoniumsulfat-gesättigten neutralen Lösung durch Säure gefällt wird, sind bereits durch die Versuchsreihe V gekennzeichnet.

Der Uebersicht halber seien die Fällungsgrenzen der Fractionen I-IV in neutraler und saurer Lösung nebeneinander gestellt:

	Fraction I		Fraction II		Fraction III		Fraction IV saure Lösg.
	neutr. Lösg.	saure Lösg.	neutr. Lösg.	saure Lösg.	neutr. Lösg.	saure Lösg.	
Untere Fällungsgrenze .	2,61)	1,2	5,4	4,7	7,2	6,3	9,3
Obere Fällungsgrenze .	4,42)	4,3	6,2	5,9	9,5	7,7	9,9

Ein Blick auf diese Tabelle lehrt, dass in Bezug auf die Fraction I und II dem Ammonsulfat in saurer Lösung eine stärkere Wirkung zukommt, als bei neutraler und bei der mit der neutralen sich fast gleichartig verhaltenden alkalischen Reaction. Die Fraction III beginnt sich in saurer Lösung ebenfalls viel früher auszuschcheiden, doch ist auch ihre obere Fällungsgrenze relativ bald erreicht, so dass zwischen dieser und der unteren Fällungsgrenze der IV. Fraction ein verhältnissmässig breiter Zwischenraum bleibt. Es lag nahe, daran zu denken, innerhalb dieses Intervalls eine Albumose isoliren zu können, welche in der neutralen und alkalischen Lösung möglicher Weise gleichzeitig mit der Fraction III ausfiel und so der Beobachtung entging; doch gaben die diesbezüglichen Versuche keinen Anhaltspunkt für diese Annahme.

1) Die zur Erreichung der unteren und 2) der oberen Fällungsgrenze nöthige Anzahl von Cubikcentimetern Ammonsulfat auf 10 ccm. der Gesamtlösung.

D. Verhalten der Fällungsgrenzen gegenüber dem Wechsel der Concentration.

Als Paradigma wählten wir die Fraction I, deren Fällungsgrenzen in 10⁰/₀, 15⁰/₀ und 20⁰/₀ Flüssigkeiten nachstehende Versuchsreihen zeigen:

Versuchsreihe IX.
Neutrale 10⁰/₀ Peptonlösung.

10 ⁰ / ₀ Lösung. ccm.	Wasser. ccm.	Gesätt. Ammon-sulfat-lösung. ccm.	Salzfällung.	Filtrat mit 0,2 ccm. gesättigter Ammonsulfat-lösung geprüft.	Bemerkung.
2	7	1	keine Trübung	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction I.
2	6	2	»	—	
2	5,8	2,2	schwach opal.	—	
2	5,6	2,4	opal.	—	
2	5	3	Trübung	—	
2	4,4	3,6	»	—	Ob. Fällungsgrenze der Fraction I.
2	4,2	3,8	»	stark opal.	
2	4	4	»	schwach opal.	
2	3,8	4,2	»	» } beim Stehen	
2	3,6	4,4	»	» } stärker	
2	3,4	4,6	»	klar } nach längerem Stehen Nachtrübungen	
2	3,2	4,8	»		
2	3	5	»		
2	2,8	5,2	»	»	
2	2,6	5,4	»	»	
2	2,4	5,6	»	klar, keine Nachtrübung	

Versuchsreihe X.
Neutrale 15⁰/₀ Peptonlösung.

15 ⁰ / ₀ Lösung. ccm.	Wasser. ccm.	Gesätt. Ammon-sulfat-lösung. ccm.	Salzfällung.	Filtrat mit 0,2 ccm. gesättigter Ammonsulfat-lösung geprüft.	Bemerkung.
2	7	1	keine Trübung	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction I.
2	6	2	»	—	
2	5,8	2,2	opal.	—	
2	3,6	4,4	Trübung	Spur opal.	Ob. Fällungsgrenze der Fraction I.
2	3,4	4,6	»	»	
2	3,2	4,8	»	klar } nach längerem Stehen Nachtrübungen	
2	3	5	»		
2	2,8	5,2	»		
2	2,6	5,4	»	»	
2	2,4	5,6	»	»	
2	2,2	5,8	»	klar, keine Nachtrübung	

Versuchsreihe XI.
Neutrale 20% Peptonlösung.

20% Lösung. ccm.	Wasser. ccm.	Gesätt. Ammon- sulfat- lösung. ccm.	Salzfällung.	Filtrat mit 0,2 ccm. gesättigter Ammonsulfat- lösung geprüft.	Bemerkung.
2	75	0,5	schwach opal. 1)	starke Opalescenz	
2	7	1	»	»	
2	6	2	»	»	Unt. Fällungs- grenze der Fraction I
2	5,8	2,2	stark opal.	»	
2	5,6	2,4	»	»	
2	5,5	2,5	»	»	
2	4	4	Trübung	opalescent	
2	3,8	4,2	»	schwächer opal.	Ob. Fällungs- grenze der Fraction I.
2	3,6	4,4	»	schwach opal.	
2	3,4	4,6	»	klar	
2	3,2	4,8	»	»	
2	3	5	»	»	
2	2,8	5,2	»	»	
2	2,6	5,4	»	»	
2	2,4	5,6	»	»	
2	2,2	5,8	»	»	
2	2	6	Fällung	klar, keine Nachtrübung	

Die Resultate sind bei allen 3 angeführten Concentrationen in Bezug auf die Fällungsgrenzen beinahe dieselben und stehen auch in Uebereinstimmung mit denen der 5% Lösung. Wenn auch diese Ergebnisse direkt nur auf die Fraction I Bezug haben, so machen sie es doch unwahrscheinlich, dass die hier in Betracht gekommenen Concentrationsgrade im Stande wären, die Fällungsgrenzen der übrigen Fractionen erheblich zu beeinflussen. In der That lassen, wenn man von geringen Schwankungen absieht, auch die folgenden auf die Fraction IV sich beziehenden Versuchstabellen diesen Schluss gerechtfertigt erscheinen; doch muss natürlich die Möglichkeit, dass sich die Grenzen bei sehr hohen, hier nicht berücksichtigten Concentrationsgraden ändern, offen gelassen werden.

1) Die Opalescenzen in den drei ersten Proben entsprechen Verunreinigungen, welche bei der Bereitung der Lösung von dem Filter in dieser Concentration nicht ganz zurückgehalten werden konnten und in die klare Flüssigkeit übergangen.

Versuchsreihe XII (Fraction IV).

Neutrales, ammoniumsulfatgesättigtes Filtrat einer 10⁰/₀ Peptonlösung.

10 % salz- gesätt. Filtrat ccm.	Wasser. ccm.	Salz- gesätt. Schwe- felsäure. ccm.	Gesätt. Ammon- sulfat. ccm.	Ammon- sulfat im Ganzen. ccm.	Salz- und Säure- fällung.	Filtrat mit Ammonsulfat- pulver gesättigt.	Bemerkung.
8	1.1	0.9	—	8.9	klar, nach einiger Zeit Spur opal.	—	untere Fällungsgrenze d. Fract. IV.
8	0.9	0.9	0.2	9.1	schwach opal.	—	
8	0.5	0.9	0.6	9.5	stark opal.	—	
8	0.3	0.9	0.8	9.7	»	opal.	ob. Grenze beinahe erreicht.
8	0.1	0.9	1	9.9	Trübung	sehr schwach opal.	

Versuchsreihe XIII (Fraction IV).

Neutrales ammoniumsulfatgesättigtes Filtrat einer 20⁰/₀ Peptonlösung.

20 % salz- gesätt. Filtrat. ccm.	Wasser. ccm.	Salz- gesätt. Schwe- felsäure. ccm.	Gesätt. Ammon- sulfat. ccm.	Ammon- sulfat im Ganzen. ccm.	Salz- und Säure- fällung.	Filtrat mit Ammon- sulfat- pulver geprüft.	Bemerkung.
8	1.1	0.9	—	8.9	zunächst klar, nach längerer Zeit opalescent	—	untere Grenze der Fraction IV.
8	0.9	0.9	0.2	9.1			
8	0.1	0.9	1	9.9	Trübung	stark opal.	obere Grenze noch nicht erreicht.

Anknüpfend an die vorhergehenden Versuchsreihen möchte ich noch der Nachtrübungen gedenken, welche bereits in der Versuchsreihe I im Anschluss an die obere Fällungsgrenze der Fraction I auftraten und die auch in der 10⁰/₀, 15⁰/₀ und 20⁰/₀ neutralen Lösung, sowie bei Bestimmung der Fällungsgrenzen dieser Fraction in ammoniakalischer Lösung zu finden waren. Sie fielen ganz allmählich aus, zunächst schleierartig, dann als dichtere Opalescenzen nach einer Zeit von 1/2 Stunde bis 2

Stunden und auch später (bis zu 24 Stunden) innerhalb bestimmter Grenzen, die nach unten zu mit der Ausfällung der Fraction I zusammenfielen, nach oben zu dem Ammonsulfatgehalt von 5,4, 5,6, 5,8 und 6 ccm. entsprachen. Es konnte bei der Regelmässigkeit des Auftretens dieser Nachtrübungen der Verdacht, dass es sich hier um einen langsamer ausfallenden Rest der Fraction I (vielleicht Theile der Heteroalbumose ([siehe unten])), handle, nicht ohne Weiteres von der Hand gewiesen werden. Dies zu entscheiden, wurde in einer aus ungefähr 30 gr. bereiteten neutralen Witte-Peptonlösung die Fraction I ausgefällt, sogleich abfiltrirt und das Filtrat zum Theil gegen die Wasserleitung dialysirt, zum Theil durch längere Zeit (ca. 48 Stunden) stehen gelassen. Letzterer Theil zeigte nach 24 Stunden eine diffuse, milchige Trübung, die sich nicht abfiltriren liess. Die Flüssigkeit wurde bis zum vollständigen Klarwerden mit Wasser verdünnt, so zwar, dass man eine $\frac{1}{4}$ gesättigte Lösung erhielt, in welcher nun die neuerliche Abscheidung der Trübung mit Ammonsulfat versucht wurde.

Versuchsreihe XIV.

$\frac{1}{4}$ gesätt. Lösung. ccm.	Wasser. ccm.	Gesätt. Ammonsulfat. ccm.	Salzfällung.	$\frac{1}{4}$ gesätt. Lösung. ccm.	Wasser. ccm.	Gesätt. Ammonsulfat. ccm.	Salzfällung.	Bemerkung.
8 (2)	1,8	0,2 (2,2)	keine Trüb.	4 (1)	3	3 (4)	keine Trüb.	{ Unt. Grenze der Fraction II.
8 (2)	1,6	0,4 (2,4)	»	4 (1)	2,8	3,2 (4,2)	»	
8 (2)	1,4	0,6 (2,6)	»	4 (1)	2,6	3,4 (4,4)	»	
8 (2)	1,2	0,8 (2,8)	»	4 (1)	2,4	3,6 (4,6)	»	
8 (2)	1	1 (3)	»	4 (1)	2,2	3,8 (4,8)	»	
8 (2)	0,8	1,2 (3,2)	»	4 (1)	2	4 (5)	»	
8 (2)	0,6	1,4 (3,4)	»	4 (1)	1,8	4,2 (5,2)	»	
8 (2)	0,4	1,6 (3,6)	»	4 (1)	1,6	4,4 (5,4)	»	
8 (2)	0,2	1,8 (3,8)	»	4 (1)	1,4	4,6 (5,6)	opal.	
8 (2)	—	2 (4)	»	4 (1)	1,2	4,8 (5,8)	»	
				4 (1)	1	5 (6)	stark opal.	

Ausser der von vornherein im Filtrate vorhandenen Fraction II war keine sofortige Abscheidung eingetreten, so dass eine Identität mit der Fraction I oder einem Theile derselben

nicht festgestellt werden konnte. — Der erste, gegen Wasser beinahe 3 Wochen dialysirte, Theil liess ebenfalls keine im salzfreien Wasser unlöslichen Bestandtheile erkennen, was immerhin gegen die Annahme einer allmählich ausfallenden Heteroalbumose sprach. Es liess sich aber auch in der eingegengten, ziemlich klaren Dialysatorflüssigkeit mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung direkt keine Fällung erzielen, ebensowenig konnten die den Nachtrübungen entsprechenden Fällungsgrenzen hier aufgefunden werden. Ist auch nach diesen und meinen anderweitigen Erfahrungen der Zusammenhang mit der Fraction I unwahrscheinlich, so muss doch dahingestellt bleiben, ob die Nachtrübungen auf eine Albumose sui generis oder aber auf Verunreinigungen, welche mit den Verdauungsprodukten des reinen Fibrins nichts gemein haben, zu beziehen sind.

Das saure salzgesättigte Filtrat nach Abscheidung von Fraction IV erwies sich durch seine Reactionen, namentlich durch seine deutliche Biuretprobe als «Pepton»-haltig. Bei näherer Prüfung ergab sich, dass sich daraus durch Fällung mit Jodjodkaliumlösung¹⁾ und nachträgliche Trennung mit Alkohol noch zwei Fractionen (V. u. VI) von dem Charakter «echter» Peptone isoliren lassen.

An zwei Liter des schwachsauren, ammoniumsulfatgesättigten Filtrats wurden mit einer ammoniumsulfatgesättigten Jodjodkaliumlösung (2 Theile Jodkalium, 1 Theil Jod) so lange versetzt, bis eine Probe der Flüssigkeit mit salzgesättigtem Jodjodkalium keine Fällung mehr gab; das Filtrat dieser Lösung zeigte kaum eine Andeutung einer Biuretprobe, so dass eine beinahe vollkommene Ausfällung der noch in Lösung befindlichen Proteinstoffe stattgefunden hatte. Der in 96% Alkohol gebrachte Niederschlag löste sich zu einem Theil in Alkohol, der andere Theil blieb ungelöst; beide gaben eine schöne, purpurfarbige Biuretprobe.

1) In Betreff dieses Verhaltens findet sich eine gelegentliche Angabe S. Fränkel's (Zur Kenntniss der Zerfallsprodukte des Eiweisses bei peptischer und tryptischer Verdauung, Wien [S. Bergmann] 1896), welcher das von ihm dargestellte Amphopepton mit Jodjodkalium fällen konnte.

Fraction V.

Der in Alkohol unlösliche Theil des Niederschlags wurde in wenig warmem Wasser gelöst, die schwachsaure jodjodkaliumhaltige Flüssigkeit mit Ammonsulfat gesättigt, neuerdings mit salzgesättigter Lugol'scher Lösung gefällt. Der im warmen Wasser gelöste Niederschlag fiel auf Zusatz von überschüssigem 96% Alkohol wieder aus und wurde nach dem Auswaschen mit Alkohol durch Schütteln mit Aether von den letzten, eventuell noch vorhandenen Jodresten befreit. Der erhaltene weisse Körper gelangte in Wasser gelöst zur Untersuchung.

Fraction VI.

Der alkohollösliche Theil wurde nach Verdunstenlassen des Alkohols in Wasser gelöst, durch Schütteln mit Aether und Aether-Chloroform jodfrei gemacht und zur Trockene eingedampft; es blieb ein fester, gelb gefärbter Körper zurück, dessen wässrige Lösung zu den später angeführten Reactionen Verwendung fand.

II. Charakterisirung der einzelnen Fractionen.

Dem Mitgetheilten zufolge lassen sich aus Witte-Pepton durch Ammonsulfat 4 Fractionen gewinnen, die den auseinander liegenden Fällungsgrenzen nach sicher verschiedenen Substanzen entsprechen. Hierzu kommen noch 2 aus dem Salzfiltrat durch Jod fällbare Fractionen. Die nächste Aufgabe musste sein, festzustellen, inwiefern diese 6 Fractionen den von Kühne und seinen Schülern unterschiedenen Albumosen und Peptonen entsprechen.

Zu diesem Zwecke wurden aus Witte-Pepton die einzelnen Fractionen dargestellt, nach Thunlichkeit gereinigt und auf ihr chemisches Verhalten geprüft.

Aus 43.6 gr. des trockenen Witte-Peptons wurde eine 5% neutrale Lösung¹⁾ hergestellt, aus der die einzelnen Fractionen entsprechend den bei neutraler Reaction gefundenen

1) Es empfiehlt sich, vor dem Abfiltriren die trübe Flüssigkeit 24 Stunden stehen zu lassen.

Fällungsgrenzen folgendermassen isolirt wurden: Die gesammte Lösung wurde mit der gleichen Menge kalt gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, nach halbstündigem Absetzenlassen aufs Filter gebracht und mit halbgesättigtem Ammonsulfat gründlich gewaschen. Die krümeligen, porösen Massen, in ca. 50 ccm. heissen Wassers gelöst, wurden abermals mit dem gleichen Volumen kaltgesättigter Salzlösung gefällt und nach dem Absetzen auf dem Filter in gleicher Weise wie früher gewaschen. Dieses Verfahren wurde zum dritten Male wiederholt. In der Waschflüssigkeit war stets nur eine geringe Trübung mit Kupfersulfat nachweisbar. Die so gereinigte Fraction wurde auf dem ausgebreiteten Filter trocknen gelassen = Fraction I.

Das halbgesättigte, bei der Darstellung der Fraction I gewonnene Filtrat wurde mit dem halben Volumen der Ammonsulfatlösung auf $\frac{2}{3}$ Sättigung gebracht, wobei sich am Gefässboden eine gelbe, schmierige Masse absetzte. Sie wurde mit einer $\frac{2}{3}$ Lösung gewaschen und wie Fraction I durch wiederholtes Lösen, Ausfällen und Waschen gereinigt, endlich auf dem Filter getrocknet. Die Ausbeute war etwas geringer als bei der Fraction I, doch vollkommen zufriedenstellend = Fraction II.

Das Filtrat der vorhergehenden Fraction wurde durch Eintragung von fein gepulvertem, möglichst reinem Ammonsulfat gesättigt. Es schied sich dabei die Fraction III in graulich weissen, zum Theile in der Flüssigkeit suspendirten Klumpen aus. Auch hier wurde, wie früher, wiederholt der Niederschlag gelöst, gefällt, mit gesättigtem Ammonsulfat gewaschen und getrocknet. Die Substanz wurde in schön weissen Krusten ziemlich reichlich gewonnen = Fraction III.

Zu der weit über 2 Liter betragenden, ammonsulfatgesättigten, neutralen Lösung, welche nach der Darstellung der drei früheren Fractionen zurückgeblieben war, wurde $\frac{1}{10}$ Volumen ammonsulfatgesättigter Schwefelsäure hinzugefügt. Nach zweitägigem Stehen setzte sich die erst entstandene milchige Trübung als weisser Bodensatz ab. Die Reinigung dieses Körpers geschah wie in den früheren Fällen. Die Ausbeute war hier verhältnissmässig am geringsten = Fraction IV.

Bot anscheinend der eingeschlagene Gang der Darstellung an und für sich volle Gewähr dafür, dass nach der Abscheidung der Fraction IV die schwach saure, ammoniumsulfatgesättigte Lösung albumosefrei war, so entsprach sie auch der von Kühne¹⁾ aufgestellten Forderung, mit Ammoniak und Ammoniumcarbonat stark alkalisch gemacht, keine Andeutung einer Trübung zu geben. Nichtsdestoweniger zeigte sich später, dass Spuren¹⁾ von Albumosen doch der Fällung entgangen waren; dieser Umstand war aber nur der geringen Concentration der letzten Lösungen beizumessen, wie sich leicht durch einfaches Eindampfen einer Probe zeigen liess, wobei die geringen Reste als Opalescenzen sichtbar wurden.

Die aus dem albumosefreien Filtrat durch Jod fällbaren Fractionen V und VI wurden in der oben angegebenen Weise dargestellt.

Bei der Untersuchung der Fraction I ergab sich, dass hier das Gemenge von primären Albumosen vorlag, wie es auch durch Sättigung mit Kochsalz und Magnesiumsulfat erhalten wird. Durch Dialyse liess es sich in Protalbumose und Heteroalbumose resp. die aus letzterer entstehende Dysalbumose mit allen charakteristischen Eigenschaften dieser Substanzen trennen. Diese Fraction bedarf daher keiner weiteren Besprechung.

Die nach Beseitigung der primären Albumosen durch Ammonsulfat erhaltenen Fractionen entsprechen in ihrer Gesammtheit dem Gemische der Deuteroalbumosen früherer Untersuchungen. Dieses besteht somit bei dem Witte-Pepton aus drei, richtiger aus mindestens drei verschiedenen Stoffen. Da es bisher nicht gelungen ist, diese einzelnen Fractionen noch weiter zu trennen, so empfiehlt es sich, sie bis auf Weiteres als einheitlich anzusehen. Ich will sie in der Reihenfolge, wie

1) Kühne, Erfahrungen über Albumosen und Peptone. Zeitschrift für Biologie. Neue Folge, Bd. 11, 1892, S. 2 u. 3.

1) Dass diese letzten Reste nicht durch einen Säureüberschuss in Lösung gehalten werden konnten, geht schon aus der Art der Darstellung hervor.

sie durch gesteigerten Salzzusatz erhalten werden, im Nachfolgenden als secundäre Albumosen A, B und C bezeichnen.

Die durch Jod abgetrennten Fractionen V und VI stellen zusammen die Hauptmenge des im Witte-Pepton enthaltenen «echten» Peptons dar; ich will sie als Pepton A (die alkoholunlösliche Fraction V) und Pepton B (die alkohollösliche Fraction VI) bezeichnen.

Die qualitativen Reactionen dieser Stoffe habe ich in nachstehender Tabelle zusammengestellt und dabei des Vergleiches wegen von den primären Albumosen die Protalbumose

Reagens	Protalbumose	Secundäre Albumose A
1. Alkohol 96%	Im Ueberschusse starke Opalescenz, die sich in der Hitze nicht verändert.	Starke Opalescenz; in der Hitze Abscheidung von Flocken, welche bei theilweisem Verdunsten des Alkohols zerfliessen.
2. Salpetersäure in der Kälte	Trübung, welche in der Hitze verschwindet, in d. Kälte wieder erscheint.	Erst bei Kochsalzzusatz beinahe bis zur Sättigung Trübung.
3. Gleiches Volumen concentr. Kochsalzlösung zu der mit Essigsäure angesäuerten Lösung gesetzt	Opalescenz, die beim Erhitzen schwindet, beim Abkühlen wieder erscheint.	Starke Trübung.
4. Aussalzen der neutralen Lösung mit Kochsalz	Opalescenz.	Opalescenz.
5. Aussalzen der mit Essigsäure angesäuerten Lösung mit Kochsalz	Starke Trübung; im Filtrate auf Zusatz von Ammonsulfat keine Trübung.	Unvollständige Fällung (im Filtrat entsteht auf Ammonsulfatzusatz starke Trübung).
6. Verdünnte Kupfersulfatlösung	Trübung.	Trübung.
7. Essigsäure-Ferrocyankalium	Trübung.	Spur Trübung.
8. Pikrinsäure	Starke Fällung, in der Hitze löslich, in der Kälte wiederkehrend.	Grosse gelbe Flocken an der Gefässwand, die sich in der Wärme sogleich lösen, in der Kälte wiederkehren.
9. Metaphosphorsäure	Kaum eine Andeutung von Trübung.	Weisser Niederschlag, der sich in der Hitze löst, in der Kälte wiederkehrt.
10. Trichloressigsäure	Trübung, in der Hitze verschwindend, in der Kälte wieder erscheinend.	Starke Fällung.
11. Gerbsäure ¹⁾	Starker Niederschlag, der in der Hitze nur zum Theil löslich ist; beim Erkalten starke Trübung.	Eine intensive Fällung, welche sich in der Wärme vollständig löst, in der Kälte wieder auftritt; sie löst sich im Ueberschusse nicht.

¹⁾ Bei den nachfolgenden Reactionen wurden 2% wässrige Lösungen der betreffenden Substanzen gebraucht mit Ausnahme der Protalbumose, welche in einer wässrigen Lösung nicht bekannter Concentration zur Verwendung gelangte; die Reaction von Adamkiewicz wurde stets mit fester Substanz ausgeführt.

²⁾ Die Reactionen 1—10 wurden ausgeführt mit einer Lösung, von der sich später herausstellte, dass sie bei neutraler Reaction durch Ammonsulfatsättigung eine Trübung zeigte, herrührend

mit berücksichtigt. Für die Reactionen wurden durchwegs wässrige, nicht zu verdünnte Lösungen der lufttrockenen Präparate hergestellt mit Ausnahme der Protalbumose, welche ich so verwendete, wie sie bei der Dialyse gewonnen wurde. Die Präparate der secundären Albumosen A, B und C enthielten geringe Reste von Ammonsulfat, welche jedoch in der vorhandenen Menge die hier angeführten Reactionen nicht beeinflussen konnten. Die Protalbumose war vollständig, die beiden Peptone beinahe ammonsulfatfrei. Das keines der Produkte durch Hitze oder durch Alkohol coagulirbar war, ist unnöthig zu betonen.

Secundäre Albumose B	Secundäre Albumose C	Pepton A	Pepton B ²⁾
Im grossen Ueberschusse eine Opalescenz, die sich in der Hitze nicht ändert.	Im Ueberschusse starke Opalescenz; in der Hitze fallen zarte, weisse Flocken aus, welche bei theilweisem Verdunsten des Alkohols zerfliessen.	Fällt im Ueberschusse.	Keine Trübung.
Erst bei Kochsalzsättigung Trübung.	Bei Kochsalzsättigung eine kaum wahrnehmbare Opalescenz.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Keine Spur einer Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Ganz schwache Opalescenz.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Spur Opalescenz. ³⁾
Ein Niederschlag, der sich sogleich in der Wärme löst, in der Kälte wieder auftritt.	Flockiger Niederschlag, der in der Hitze verschwindet, in der Kälte wieder auftritt.	Nach längerem Stehen eine leichte Opalescenz, die in der Hitze schwindet, in der Kälte wiederkehrt.	Trübung, welche in der Hitze schwindet, in der Kälte wiederkehrt.
Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Ein sich in der Hitze lösender, in der Kälte wieder auftretender Niederschlag.	Sehr schwache Opalescenz, in der Hitze verschwindend, in der Kälte wiederkehrend.	Keine Trübung.	Trübung, in der Hitze löslich, beim Erkalten wiederkehrend.
Sehr starke Fällung, beim Erwärmen sich auflärend, beim Abkühlen wieder auftretend.	Fällt sehr leicht; der Niederschlag wird beim Erwärmen gelöst, beim Erkalten tritt er wieder auf; im Ueberschusse ist er unlöslich.	Gibt eine beim Erwärmen sich lösende, beim Abkühlen wieder ausfallende Trübung.	Massenhafter Niederschlag, der sich in der Wärme löst, beim Erkalten wieder ausfällt. ³⁾

von Verunreinigungen mit einer Albumose. Auf diese ist jedenfalls die schwache Essigsäure-Ferrocyanalkaliumreaction zurückzuführen. Behufs Reinigung wurde das Pepton bei neutraler Reaction mit Ammonsulfat in der Hitze gesättigt, mit $\frac{1}{10}$ Volumen ammonsulfatgesättigter Schwefelsäure angesäuert, nach 24 Stunden abfiltrirt und das Filtrat auf dem Wasserbade eingengt.

³⁾ Diese und die folgenden Reactionen beziehen sich auf ein völlig albumosefreies Präparat.

Reagens	Protalbumose	Secundäre Albumose A
12. Jodquecksilberkalium	Erst in saurer Lösung Trübung, welche sich im Ueberschuss von Salzsäure löst.	1 Tropfen gibt einen starken Niederschlag, der sich im grossen Ueberschuss von Salzsäure nicht löst.
13. Millon'sche Reaction	Positiv.	Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.
14. Xanthoproteinprobe	Auf Zusatz von Salpetersäure schon in der Kälte Gelbfärbung.	Schon in der Kälte Gelbfärbung.
15. Adamkiewicz'sche Reaction	Deutliche Violettfärbung.	Violettfärbung.
16. Molisch'sche Zuckerprobe	Schwach positiv.	Positiv.
17. Biuretprobe mit Kupfersulfat	Violettfärbung.	Rothfärbung.
18. Biuretprobe mit Nickelsulfat	Beim Erwärmen Gelbfärbung.	Schöne Gelbfärbung.
19. Kochen mit Alkali- und Bleiacetat	Braunfärbung; doch schwächer als bei secundärer Albumose A.	Intensive schwarzbraune Färbung.

Von den in vorstehender Tabelle verzeichneten Befunden verdienen einige nähere Betrachtung.

Zunächst ist ersichtlich, warum die sonst übliche Trennung der primären und secundären Albumosen mittelst Kochsalz oder Kochsalz und Essigsäure ein unbefriedigendes Resultat gibt. Wie schon Kühne und Neumeister bekannt war, ist die Abscheidung der primären Albumosen durch Sättigung mit Kochsalz eine unvollständige. Sättigung mit Kochsalz und Zusatz von Essigsäure fällt jedoch einen Theil der secundären Albumosen neben den primären und zwar, wie aus meinen Versuchen hervorgeht, der secundären Albumosen A und B.

Ferner erhält die von Neumeister gehegte Vermuthung, dass die in neutrale gesättigte Ammonsulfatlösung übergehende Albumose eine bestimmte Art von Albumose darstellt (er leitet sie von der Protalbumose ab) eine Bestätigung. Während Neumeister jedoch annahm, dass diese Albumose (bei mir die secundäre Albumose C) auch in dem durch Ammonsulfat fällbaren Gemenge vorhanden ist, muss ich nach meinen Versuchen das Gegentheil annehmen.

Wichtiger aber ist, dass sich in dem reactionellen Verhalten der einzelnen getrennten Albumosen und Peptone nicht

Secundäre Albumose B	Secundäre Albumose C	Pepton A	Pepton B
Sehr starke Fällung, bei grossem Salzsäureüberschuss löslich.	Fällt direkt; bei geringem Zusatz von Salzsäure löst sich die Trübung.	Direkt, ebenso auf Zusatz von Salzsäure negativ.	Weisser, in Wasser sich lösender Niederschlag.
Fällung, beim Kochen Rothfärbung.	Fällung, beim Kochen Rothfärbung.	Sehr schwache, beinahe keine Trübung; bei längerem Kochen blasse Rosafärbung.	Negativ.
Schon in der Kälte Gelbfärbung.	Erst beim Erhitzen Gelbfärbung.	Beim Kochen sehr schwache Gelbfärbung.	Negativ.
Violettfärbung.	Violettfärbung.	Aeusserst undeutlich; eine Spur von Rothfärbung, keine Violettfärbung.	Negativ.
Positiv.	Nach längerem Erwärmen Violettfärbung.	Sehr schöne karminrothe Färbung.	Negativ.
Rothfärbung.	Schöne Violettfärbung.	Etwas schwächer als sonst; purpurfarben.	Sehr schöne Rothfärbung.
Gelbfärbung.	Beim Erwärmen Gelbfärbung.	Schwache Gelbfärbung.	Sehr schöne Gelbfärbung.
Nach kurzem Kochen Gelbfärbung, später geringe Ausscheidung von Schwefelblei.	Selbst nach längerem Kochen negativ.	Auch nach längerem Kochen negativ.	Negativ.

bloss eine Verschiedenheit des physikalischen Verhaltens (somit der Molekulargrösse), sondern auch der Constitution unverkennbar ausprägt.

In dieser Richtung sind vor Allem von Wichtigkeit die Millon'sche und die Xanthoproteinreaction, welche die Anwesenheit einer bestimmten aromatischen Gruppe (der Oxyphenylgruppe) anzeigen, ferner die Molisch'sche Probe als Kennzeichen der Anwesenheit von Kohlenhydratgruppen, die Bleioxydreaction als Nachweismittel von unoxyditem, abspaltbarem Schwefel, die Biuretreaction als Ausdruck einer eigenthümlichen Configuration der Amidocarbonylgruppe,¹⁾ endlich die Alkaloidreactionen als Beweismittel für die Anwesenheit basenbildender Gruppen.

Wie Hofmeister¹⁾ jüngst auseinandergesetzt hat, kommt auch der Adamkiewicz'schen Probe eine eigenthümliche Bedeutung zu, insofern ein positives Ergebniss auf die gleichzeitige Anwesenheit von Kohlenhydrat neben aromatischen

1) Hugo Schiff, Biuretreactionen. Berichte der deutschen chem. Gesellschaft. Jahrg. 29. Nr. 2 S. 298.

1) Hofmeister, Untersuchungen über die Proteinstoffe. I. Ueber jodirtes Eieralbumin. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. 24 S. 166.

Gruppen, welche die Millon'sche Probe geben, schliessen lässt.

Aus obiger Tabelle ist ersichtlich, dass die Biuretreaction und die Alkaloidreactionen keiner der dargestellten Fractionen fehlt. Nimmt man das Zusammenvorkommen dieser Reactionen mit Kossel¹⁾ als typisch für die Anwesenheit eines Protamin-kerns an, so müssen sie sämmtlich als Protaminabkömmlinge angesehen werden. Daneben aber zeigen sie in Betreff der durch Millon nachweisbaren Oxyphenylgruppe, der Kohlenhydratgruppe und der Anwesenheit von nicht oxydirtem Schwefel nachstehende Verschiedenheiten:

	Oxyphenyl- gruppe.	Kohlenhydrat- gruppe.	Nicht oxydirter abspaltbarer Schwefel.
Primäre Albumosen	vorhanden	vorhanden	vorhanden
Secundäre Albumose A	„	„	sehr reichlich
„ „ B	„	„	spärlich
„ „ C	„	„	fehlt
Pepton A	spärlich	„	fehlt
„ B	fehlt	fehlt	fehlt

Die Tragweite dieser Verschiedenheiten bedarf noch einer genaueren Prüfung. In Betreff des Fehlens der Millon'schen Reaction bei Pepton B und der Schwefelreaction bei beiden Peptonen ist zu beachten, dass die Erfahrungen über Einwirkung von Jod auf Eiweiss (siehe Hopkins¹⁾ und Hofmeister²⁾ gezeigt haben, dass dieselbe, allerdings bei intensiverer Reaction, als sie hier vorlag, das Verschwinden der Millon-

1) Kossel, Ueber die einfachsten Eiweisskörper. Sitzungsberichte der Gesellschaft zur Beförderung der ges. Naturwissenschaften zu Marburg. Nr. 5. Juli 1897.

1) F. G. Hopkins, Untersuchungen über die Einwirkung der Halogene auf Eiweiss. (Vorläufige Mittheilung.) Berichte der deutschen chem. Gesellschaft. 30. Jahrg. Nr. 14, S. 1860.

2) a. a. O.

schen Reaction und die Oxydation des Schwefels bewirken kann. Es bleibt somit noch festzustellen, ob das obige Verhalten durch eine solche secundäre Reaction zu erklären ist oder nicht. Da andere Autoren die Peptone frei von bleischwärzendem Schwefel gefunden haben, scheint dies nicht der Fall zu sein. Ganz besonders auffällig ist aber das Fehlen der Molisch'schen Reaction, demnach des Kohlenhydratcomplexes, bei Pepton B, während er allen anderen zukommt. Pepton B steht in diesem, wie in seinem übrigen Verhalten, weit von dem Eiweissmolekül ab. Man könnte es danach direkt als ein Glutinpepton ansprechen. Ferner ist hervorzuheben, dass die secundäre Albumose C ihrem Verhalten nach und wegen des Fehlens von nicht oxydirtem Schwefel eine Mittelstellung zwischen den secundären Albumosen und den «echten» Peptonen einnimmt, welche die Verwendung der Schwefelreaction resp. des Schwefelgehaltes als Unterscheidungsmittel der Albumosen und Peptone¹⁾ nicht als empfehlenswerth erscheinen lässt.

Meine nächste Aufgabe wird es sein, die nach obigem Vorgang isolirten Fractionen weiter auf ihre Einheitlichkeit zu prüfen, schärfer zu charakterisiren und die genetische Beziehung, in welcher sie zueinander stehen, klarzulegen.

¹⁾ Hugo Schrötter, Beiträge zur Kenntniss der Albumosen (II. Mittheilung). Sitzungsbericht der mathem.-naturwiss. Classe d. k. Akademie d. Wiss. in Wien. Jahrg. 1895, S. 448.