

Die fractionirte Abscheidung der peptischen Verdauungs- produkte mittelst Zinksulfat.

Von

Dr. E. Zunz (Brüssel).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 19.
(Der Redaction zugegangen am 28. März 1899.)

E. P. Pick¹⁾ hat durch fractionirte Fällung mit Ammonsulfatlösung, nach dem von Hofmeister und seinen Schülern Kauder,²⁾ Pohl,³⁾ Lewith⁴⁾ und Reye⁵⁾ schon in früheren Untersuchungen mit Erfolg angewendeten Verfahren, die Trennung der verschiedenen Albumosen, die in dem käuflichen Witte-Pepton enthalten sind, erreicht. Auf diese Art gewinnt man vier Fractionen, deren erste aus Kühne's primären Albumosen besteht und durch Dialyse annähernd in Protalbumose und Heteroalbumose getrennt werden kann, während die drei anderen, welche Pick vorläufig secundäre Albumosen A, B, C genannt hat, zusammen dem Gemenge der Deuteroalbumosen früherer Untersucher entsprechen. Zu einer nach 24stündigem Stehen abfiltrirten und genau neutralisirten Peptonlösung setzt man das gleiche Volum einer kaltgesättigten Ammonsulfatlösung

1) E. P. Pick, Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen und Peptonen. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, 1897, S. 246.

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

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

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

5) W. Reye, Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Inaugural-Dissertation, Strassburg 1898.

(vom specifischen Gewicht 1,253—1,255) hinzu, wodurch die primären Albumosen gefällt werden. Das mit Ammonsulfatlösung zu $\frac{2}{3}$ gesättigte Filtrat lässt die secundäre Albumose A ausfallen. Um die secundäre Albumose B niederzuschlagen, wird das $\frac{2}{3}$ gesättigte Filtrat mit feingepulvertem Ammonsulfat vollends gesättigt. Endlich fügt man zu dem dritten Filtrat $\frac{1}{10}$ Volum ammoniumsulfatgesättigter $\frac{1}{10}$ -normaler Schwefelsäure hinzu: die secundäre Albumose C setzt sich nach einigen Tagen ab. Nach der Trennung dieser vier Fractionen enthält die Flüssigkeit nur echte Peptone, von welchen Pick zwei, das alkoholunlösliche Pepton A und das alkohollösliche Pepton B, unterscheiden konnte.

Die Fällung der Albumosen durch Ammonsulfat ist wenigstens theilweise dadurch bedingt, dass dieses leichtlösliche Salz ihnen Wasser entzieht. Verschiedene Salze indessen, so unter anderen Zinksulfat und Kaliumacetat,¹⁾ besitzen (dem Gewichte nach) eine noch grössere Löslichkeit in Wasser und erscheinen darnach zu gleichem Zwecke verwendbar.

Nach Bömer²⁾ fällt eine gesättigte Zinksulfatlösung die Albumosen ebenso gut wie Ammonsulfat. Mit kleinen Mengen feingepulverten Zinksulfats erhält man zunächst einen starken flockigen Niederschlag, der zum grössten Theil aus Zinkphosphat gebildet ist und sich in wenig Salzsäure oder Salpetersäure löst. Wenn man daher die Albumosenlösung vorher leicht ansäuert, so bildet sich dieser Zinkphosphatniederschlag nicht. K. Baumann und Bömer³⁾ haben nun gefunden, dass die Fällung der Albumosen am vollkommensten erfolgt, wenn man auf je 100 ccm. ihrer Lösung 2 ccm. Schwefelsäure (1 Volum concentrirter Schwefelsäure, 4 Volume Wasser) hinzufügt. Sie sättigen die so angesäuerte Lösung in der Kälte mit feingepulvertem Zinksulfat, so dass sich nach 24 stündigem

1) Vgl. übrigens S. Lewith, l. c.

2) A. Bömer, Zinksulfat, ein Fällungsmittel für Albumosen. Zeitschr. f. analyt. Chemie, Bd. 34, S. 562.

3) K. Baumann und A. Bömer, Ueber die Fällung der Albumosen durch Zinksulfat. Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel, Bd. I, 1898, S. 106.

stehen Zinksulfatkrystalle wieder ausscheiden. Der Niederschlag wird dann auf ein Filter gebracht und mit einer schwach angesäuerten kaltgesättigten Zinksulfatlösung gewaschen. Das Filtrat enthält keine Spur Albumosen mehr, und die Peptone können daraus direkt durch Phosphorwolframsäure gefällt werden. Bei solchem Verfahren kann man dann den Albumosenstickstoff unmittelbar nach Kjeldahl bestimmen.

Es war wünschenswerth, zu erfahren, ob es auch mit Zinksulfat gelingt, die verschiedenen Albumosen, welche Pick mit Ammonsulfat erhalten hat, von einander zu trennen. Auf Vorschlag von Herrn Professor Hofmeister habe ich mich mit der Frage beschäftigt und theile im Nachstehenden meine Erfahrungen mit.

Ich habe zunächst einige vorläufige Versuche angestellt. Aus einer neutralen 5^o igeu Witte-Peptonlösung habe ich durch Fällung mit Ammonsulfat die verschiedenen Albumosen dargestellt, sie durch wiederholtes Lösen und Füllen, wie es Pick in seiner Arbeit vorschreibt, gereinigt, und ihre Fällungsgrenzen in wässriger Lösung mit Hilfe einer kaltgesättigten Zinksulfatlösung (specifisches Gewicht = 1,450)¹⁾ bestimmt. Nachdem ich auf diese Weise gefunden hatte, dass die isolirten Albumosen durch ungleiche Mengen Zinksulfat gefällt werden, habe ich versucht, ihre Fällungsgrenzen in Gemengen, neutralen oder sauren Witte-Peptonlösungen verschiedener Concentration, festzustellen.

Diese Lösungen wurden so hergestellt, dass das trockene Pepton mit heissem Wasser übergossen und die Flüssigkeit nach 24stündigem Stehen von der kleinen Menge des feinflockigen Bodensatzes abfiltrirt wurde. Das klare Filtrat reagierte immer alkalisch. Um es zunächst neutral zu machen, wurde tropfenweise verdünnte Schwefelsäure hinzugesetzt, sodann wurden zu je 100 ccm. der neutral gemachten Lösung 2 ccm. Schwefelsäure (1 Volum concentrirte Schwefelsäure, 4 Volume Wasser) hinzugefügt. Manchmal musste die Lösung nochmals filtrirt werden, nachdem ihr die gewünschte saure Reaction ertheilt worden war. Trotz mehrfacher Filtration waren die 20^o igeu Lösungen, besonders die neutralen, immer ein wenig trüb.

1) Das specifische Gewicht der kaltgesättigten Zinksulfatlösung wird regelmässig zu 1,450 gefunden, nur ausnahmsweise höher, bis 1,453.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei Pick. In jeder Versuchsreihe wurde mittelst graduirter Büretten zu einem bestimmten Volum der Peptonlösung zunächst so viel destillirtes Wasser hinzugefügt, als nöthig war, das schliessliche Gesamtvolum auf 10 cem. zu ergänzen, und dann eine von Probe zu Probe um 0,2 cem. zunehmende Quantität der kaltgesättigten Zinksulfatlösung zugesetzt. Die gleichmässige Mischung der Flüssigkeiten wurde durch gelindes Schütteln der Eprouvette unter Vermeidung von Schaumbildung erzielt. Die Concentration, bei der die erste bleibende Trübung eintrat, wurde als untere Fällungsgrenze angenommen. Der Inhalt der Eprouvetten wurde nach 24 Stunden, manchmal erst nach zwei Tagen, durch Doppelfilter abfiltrirt. Zu jedem Filtrate wurden 0.2 cem. der kaltgesättigten Zinksulfatlösung hinzugesetzt: das zuerst vollständig klar bleibende Filtrat ergab die obere Fällungsgrenze. Um die Fällungsgrenzen der nachfolgenden Fraction zu erhalten, wurde stets zuerst die vorhergehende abgeschieden. Um immer mit derselben Concentration an Pepton zu arbeiten, bin ich, nach dem Beispiele von Pick, so weit es möglich war, von einer Peptonmenge, die 2 cem. der zuerst angewendeten Lösung entsprach, ausgegangen.

I. Fractionirungsversuche.

A. Bestimmung der Fällungsgrenzen der nach E. P. Pick dargestellten Albumosen in neutralen Lösungen.

Versuchsreihe I. Primäre Albumosen.

5%ige Lösung der primären Albumosen cem.	Wasser cem.	Zink-sulfat-lösung cem.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0.2 cem. Zink-sulfat-lösung	Bemerkungen
2	5	3	keine Trübung	—	
2	4.8	3.2	„	—	
2	4.6	3.4	„	—	
2	4.4	3.6	leichte Opalescenz	leichte Opalescenz	Unt. Fällungsgrenze der primären Albumosen.
2	4.2	3.8	Fällung	Opalescenz	
2	4	4	„	„	
2	3.8	4.2	„	schwache Opalescenz	
2	3.6	4.4	„	„	
2	3.4	4.6	„	„	

5%ige Lösung der primären Albumosen ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0.2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
2	3.2	4.8		sehr schw. Opalescenz	
2	3	5		klar	Ob. Fällungsgrenze der primären Albumosen
2	2.8	5.2			
2	2.6	5.4			
2	2.4	5.6			
2	2.2	5.8			
2	2	6			

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, dass aus einer 5%igen Lösung die primären Albumosen bei einem Gehalt von 3.6 Volum kaltgesättigter Zinksulfatlösung in 10 Gesamtvolum auszufallen beginnen, und dass die Fällung bei halber Sättigung zu Ende ist.

Mit einer 2.5%igen Albumosenlösung wurden die Fällungsgrenzen bei 3.6 und 5.2 ccm. in 10 ccm. Gesamtflüssigkeit ermittelt.

Versuchsreihe II. Secundäre Albumose A.

Concentration der Albumosenlösung 2,5% . Verwendet für den einzelnen Versuch 2 ccm.

Die zur Verfügung stehende Menge der secundären Albumose A war nicht genügend, um eine 5%ige Lösung herzustellen, um so mehr, als die Versuchsreihe (wie auch sonst) mehrere Male wiederholt wurde. Uebrigens ändern sich, wie wir soeben für die primären Albumosen gesehen haben und wie es auch für die secundäre Albumose B nachweisbar ist, die Fällungsgrenzen durch diese Aenderung der Concentration nur unwesentlich.

Die untere Fällungsgrenze wurde bei einem Gehalt von 5.4 ccm. Zinksulfatlösung, die obere bei 6,8 ccm. auf 10 ccm. Gesamtflüssigkeit gefunden. Der Einfachheit wegen kann man den Zinksulfatgehalt der gesättigten Lösung gleich 1 setzen und analog den Ausdrücken Halbsättigung etc. die betreffende Con-

centration in vorliegendem Falle, als 0,54-, beziehungsweise 0,68-Sättigung, bezeichnen.

Versuchsreihe III. Secundäre Albumose B.

a) Concentration der Albumosenlösung 10^o o. Verwendet für den einzelnen Versuch 1 ccm.

Der Beginn der Fällung wurde bei 0,68-Sättigung, das Ende bei 0,86-Sättigung gefunden.

b) Concentration der Albumosenlösung 5^o o. Verwendet für den einzelnen Versuch 2 und 1 ccm.

Der Beginn der Fällung fand sich bei 0,7-Sättigung, das Ende der Fällung, zwischen 0,8- und 0,9-Sättigung gelegen, wurde nicht genauer bestimmt.

Versuchsreihe IV. Secundäre Albumose C.

Die kaltgesättigte Zinksulfatlösung gibt mit einer 5^o oigen Lösung der secundären Albumose C keine Trübung, selbst nach längerem Stehen. Sättigt man aber mit dem feingepulverten Salze, so erhält man nach 24 Stunden einen flockigen Niederschlag. Wiederholt man denselben Versuch, indem man einen Tropfen concentrirter Schwefelsäure hinzusetzt, so erscheint der flockige Niederschlag früher und ist in grösserer Menge vorhanden: das klare Filtrat davon trübt sich durch Zusatz eines Tropfens concentrirter Schwefelsäure nicht.

Aus den Versuchen, die soeben mitgetheilt wurden, ergibt sich, dass das Zinksulfat die verschiedenen Albumosen, welche Pick durch fractionirte Fällung mittelst Ammonsulfats isolirt hat, ebenfalls fällt. Der zu diesem Zwecke für 10 ccm. Gesammtlösung nöthige Gehalt ist 3,6 bis 5 ccm. der kaltgesättigten Lösung für die primären Albumosen, 5,4 bis 6,8 ccm. für die secundäre Albumose A, 6,8 bis 8,8 ccm. für die secundäre Albumose B, während die Deuteroalbumose C nur durch Sättigung mit dem feingepulverten Salze gefällt wird. Die Intervalle zwischen den Fällungsgrenzen sind viel geringer als bei der Ammonsulfatfällung, doch greift keine Fraction in die folgende ein.

Die verschiedenen Albumosen können auch mit einer Kaliumacetatlösung vom specifischen Gewicht 1,350 vollständig gefällt werden. Die untere und obere Fällungsgrenze sind in diesem Fall 1,4 und 3 ccm. für die primären Albumosen, 3,2 und 4,4 ccm. für die Deuteroalbumose A, 6 und 7,6 ccm. für die Deuteroalbumose B. Die untere Fällungsgrenze der Deuteroalbumose C ist 8,6 ccm: die obere Fällungsgrenze konnte ich leider nicht mit Sicherheit feststellen. Sättigt man aber die Lösung der Deuteroalbumose C mit feingepulvertem Kaliumacetat, so trübt sich das klare Filtrat durch Zusatz von Eisessig nicht mehr.

Da das Kaliumacetat selbst mit ziemlich verdünnten Ammonsulfatlösungen einen krystallinischen Niederschlag gibt, so müssen die Albumosenlösungen, falls sie Ammonsulfat enthalten, vor der Fractionirung mit Kaliumacetat während einiger Tage dialysirt werden. Um Irrthümer in der Bestimmung der Fällungsgrenzen der verschiedenen Albumosen zu vermeiden, muss das Kaliumacetat vorher von den Spuren von Kalksalzen, welche es oft enthält, befreit werden. Da man von Kaliumacetat nicht mit Sicherheit kaltgesättigte Lösungen von annähernd gleichem specifischen Gewicht bereiten kann, habe ich, um stets unter denselben Bedingungen zu experimentiren, alle meine Versuche mit Lösungen vom specifischen Gewicht 1.350 angestellt.

Auf Grund der vorliegenden Versuche liess sich hoffen, die Trennung der verschiedenen Albumosen in einer Witte-Peptonlösung durch Zinksulfat erreichen zu können. Die nachfolgend mitgetheilten Versuche bestätigten diese Erwartung.

B. Bestimmung der Fällungsgrenzen in neutraler Witte-Peptonlösung.

Versuchsreihe V.

5%ige neutrale Pepton- lösung ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung. ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
2	3,6	4,4	keine Trübung	—	
2	3,4	4,6	leichte Opalescenz	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction I

5%ige neutrale Pepton- lösung ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0.2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
2	3,2	4,8	stärkere Opalescenz	—	
2	3	5	deutliche Trübung	leichte Opalescenz	
2	2,8	5,2	Fällung	»	
2	2,6	5,4	»	»	
2	2,4	5,6	»	»	
2	2,2	5,8	»	klar	Ob. Fällungsgrenze der Fraction I
2	2	6	»	»	

Durch einen Zinksulfatgehalt von 0,46-Sättigung ab wird also eine Fällung erzielt, die bei 0,58-Sättigung ihr Ende erreicht, und die ich vorläufig Fraction I nennen will.

Versuchsreihe VI.

Die Fraction I wird durch Zusatz von 1 1/2 Volumen der kaltgesättigten Zinksulfatlösung ausgefällt. Mit dem nach 24 stündigem Stehen gewonnenen, 0,6-gesättigten, klaren Filtrat wird die folgende Versuchsreihe angestellt:

0,6 ge- sättigtes, 5%iges neutrales Pepton- filtrat ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0.2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
5 (2)	2,4	2,6 (5,6)	keine Trübung	—	
5 (2)	2,2	2,8 (5,8)	leichte Opalescenz	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction II

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

2) Die zweite Zahl gibt den Gesamtsalzgehalt (Salzgehalt des 0,6-gesättigten Filtrates nebst zugesetztem Salze) an.

0,6 ge- sättigtes, 5%iges neutrales Pepton- filtrat ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
5 (2)	2	3 (6)	stärkere Opalescenz	—	
5 (2)	1,8	3,2 (6,2)	Trübung	leichte Opalescenz	
5 (2)	1,6	3,4 (6,4)			
5 (2)	1,4	3,6 (6,6)			
5 (2)	1,2	3,8 (6,8)			
5 (2)	1	4 (7)			
5 (2)	0,8	4,2 (7,2)			
5 (2)	0,6	4,4 (7,4)		klar	
5 (2)	0,4	4,6 (7,6)			Ob. Fällungsgrenze der Fraction II

Nach Ausfällung der Fraction I kann man durch einen Salzgehalt von 0,58-Sättigung ab einen zweiten Niederschlag erhalten, den ich als Fraction II bezeichnen will. Diese Fraction wird durch 0,74-Sättigung gänzlich gefällt.

Versuchsreihe VII.

Nachdem durch 2 Volume der kaltgesättigten Zinksulfat-
lösung die Fractionen I und II gefällt wurden, wird mit dem
zu $\frac{2}{3}$ gesättigten Filtrate nachfolgende Versuchsreihe angestellt:

$\frac{2}{3}$ ge- sättigtes, 5%iges neutrales Pepton- filtrat ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
6 (2)	1,6	2,4 (6,4)	keine Trübung	—	
6 (2)	1,4	2,6 (6,6)	schwache Opalescenz	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction III
6 (2)	1,2	2,8 (6,8)	starke Opalescenz	leichte Opalescenz	
6 (2)	1	3 (7)	Trübung		

$\frac{2}{3}$ gesättigtes, 5%iges neutrales Peptonfiltrat ccm.	Wasser ccm.	Zinksulfatlösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfatlösung	Bemerkungen
6 (2)	0,8	3,2 (7,2)			
6 (2)	0,6	3,4 (7,4)			
6 (2)	0,4	3,6 (7,6)			
6 (2)	0,2	3,8 (7,8)			
6 (2)	—	4 (8)			
3 (1)	0,6	6,2 (8,2)			
3 (1)	0,6	6,4 (8,4)			
3 (1)	0,4	6,6 (8,6)			
3 (1)	0,2	6,8 (8,8)		klar	Ob. Fällungsgrenze
3 (1)	—	7 (9)		,	der Fraction III.

Es geht aus dieser Tabelle hervor, dass ein Gehalt an Zinksulfat von $\frac{2}{3}$ -Sättigung ab aus der neutralen 5%igen Witte-Peptonlösung eine dritte Fraction zur Abscheidung bringt, die bei 0,88-Sättigung völlig ausgefällt ist.

Um dasselbe Gesamtvolum zu behalten, musste ich mich bei der Bestimmung der oberen Fällungsgrenzen mit nur 1 ccm. der Peptonlösung begnügen. Dagegen könnte man einwenden, dass die Filtrate bereits zu verdünnt gewesen seien, um ausreichend deutliche Opalescenzen zu geben. In diesem Falle hätte ich eine etwas zu niedrige obere Fällungsgrenze erhalten. Dies war aber nicht der Fall, da ich an 10- und 20%igen Peptonlösungen genau dieselbe obere Fällungsgrenze fand.

Versuchsreihe VIII.

Zu einem Volum Witte-Peptonlösung werden 9 Volume der kaltgesättigten Zinksulfatlösung hinzugesetzt. Das so gewonnene klare Filtrat enthält die Fractionen I, II und III nicht mehr. Wird das Filtrat in der Kälte mit feingepulvertem Zinksulfat gesättigt, so trübt sich die Flüssigkeit deutlich. Nach 24stündigem Stehen wird die Flüssigkeit abfiltrirt. Wird zu dem klaren Filtrate ein Tropfen concentrirter Schwefelsäure hinzugefügt, so entsteht eine deutliche Trübung. Durch Zusatz von feingepulvertem Salz kann man also eine vierte Fraction isoliren. Diese wird nur unvollständig gefällt, wenn man von

neutraler Peptonlösung ausgeht: aus sauren Peptonlösungen hingegen kann man sie, wie später ersichtlich, vollständig abcheiden.

Vergleicht man die durch die fractionirte Fällung einer neutralen 5^o igen Witte-Peptonlösung mittelst Zinksulfats erhaltenen Ergebnisse mit denen der fractionirten Fällung durch Ammonsulfat, so ergibt sich, dass man in beiden Fällen vier Fractionen erhält, wovon die drei ersten durch das Salz allein gänzlich gefällt werden, während die vierte nur durch Zusatz von Säure zur salzgesättigten Flüssigkeit gänzlich zur Abscheidung kommt. Je nach der Art des verwendeten Salzes sind die Fällungsgrenzen der einzelnen Fractionen verschieden, wie sich dies aus der nachfolgenden Tabelle ergibt, in der die Fällungsgrenzen in Bruchtheilen der Sättigungsconcentration ausgedrückt sind.

	Fraction I		Fraction II		Fraction III	
	Ammon-sulfat	Zink-sulfat	Ammon-sulfat	Zink-sulfat	Ammon-sulfat	Zink-sulfat
Untere Fällungsgrenze	0.26	0.46	0.54	0.58	0.72	0.66
Obere Fällungsgrenze	0.44	0.58	0.62	0.74	0.95	0.88

Um die Fractionen I und II zu fällen, sind grössere Mengen der kaltgesättigten Zinksulfatlösung als der Ammonsulfatlösung erforderlich, während im Gegentheil die Fraction III durch ein geringeres Volumen Zinksulfat als Ammonsulfat gefällt wird. Bei Verwendung des Ammonsalzes liegen die Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen weit genug von einander, um Trennung der verschiedenen Albumosen zu ermöglichen. Bei Benutzung von Zinksulfat beginnt jedoch die Fällung jeder Fraction gleich bei der oberen Fällungsgrenze der unmittelbar

vorhergehenden unteren Fraction (Fraction II) oder selbst vor dieser Grenze (Fraction III).¹⁾

E. P. Pick hat gezeigt, dass bei Anwendung von Ammonsulfat die Concentration der Witte-Peptonlösung kaum merklichen Einfluss auf die Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen hat. Für die Fraction I (primäre Albumosen) lagen die Fällungsgrenzen, die er mit neutralen Peptonlösungen von verschiedenen Concentrationen erhielt, bei 0,22- bis 0,26-Sättigung als unterer Grenze einerseits und bei 0,44- bis 0,46-Sättigung als oberer Grenze andererseits.

Bei Fällung mit Zinksulfat ist jedoch die Concentration von grösserem Einfluss, wenigstens in Betreff der ersten Fraction, indem deren untere Fällungsgrenze umsomehr heruntergeht, je höhere Concentration die Peptonlösung aufweist. Was die anderen Fractionen betrifft, so verändern sich deren Fällungsgrenzen kaum, wie das aus der nachfolgenden Tabelle hervorgeht, in welcher wieder der Salzgehalt in Bruchtheilen der Sättigungsconcentration (= 1) ausgedrückt ist.

	Fraction I				Fraction II		Fraction III	
	2% neutr. Lösung	5% neutr. Lösung	10% neutr. Lösung	20% neutr. Lösung	5% neutr. Lösung	20% neutr. Lösung	5% neutr. Lösung	20% neutr. Lösung
	Untere Fällungsgrenze	0,46	0,46	0,36	0,32	0,58	0,58	0,66
Obere Fällungsgrenze	0,56	0,58	0,54	0,6	0,74	0,68	0,88	0,88

1) Mit einer Kaliumacetatlösung (D = 1,350) kann man ebenfalls aus der neutralen 5%igen Witte-Peptonlösung vier Fractionen isoliren, wovon die drei ersten die untere Fällungsgrenze bei 2,4, 3,2 und 5,6 cm. in 10 cm. Gesamtlüssigkeit aufweisen. Die oberen Fällungsgrenzen hingegen lassen sich sehr schwer feststellen; sie sind aber annähernd 3 cm. für die Fraction I und 4,6 cm. für die Fraction II, während es mir unmöglich war, sie für die Fraction III zu bestimmen. Ausser bei der ersten Fraction erfolgt die Fällung sehr träge. So z. B. sieht man bei Fraction III nach entsprechendem Salzzusatz in 48 Stunden erst leichte Opalescenzen. Durch Sättigung mit dem feingepulverten Salze

In allen Fällen wird die Fraction IV nur durch Sättigung mittelst feingepulverten Salzes gefällt: das klare Filtrat enthält dann aber noch stets nicht gefällte Albumosen.

C. Bestimmung der Fällungsgrenzen in saurer Witte-Peptonlösung.

Soeben haben wir gesehen, dass die Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen, welche man mittelst der kaltgesättigten Zinksulfatlösung in neutralen 5- bis 20%igen Witte-Peptonlösungen bekommt, ineinandergreifen und dass nach Sättigung mit dem feingepulverten Salze im Filtrate noch ungefallte Albumosen zurückbleiben. Wie schon früher mitgetheilt, haben K. Baumann und Bömer festgestellt, dass die Fällung der Albumosen am vollständigsten ist, wenn man zu 100 ccm. der sie enthaltenden Lösung 2 ccm. Schwefelsäure (1 Volum concentrirte Schwefelsäure, 4 Volume Wasser) hinzusetzt. Ich habe daher auch die Fällungsgrenzen der verschiedenen Albumosen in Lösungen von diesem Säuregehalt festgestellt.

In den ersten einschlägigen Versuchen habe ich die Peptonlösung allein angesäuert, was nicht ganz ohne Nachtheile ist. Wenn auch die kaltgesättigte Zinksulfatlösung stets eine leicht saure Reaction aufweist, so vermindert ihr Zusatz doch den relativen Säuregrad und zwar umsomehr, je mehr man hinzufügt, am meisten darnach bei Sättigung. Nun ist es natürlich zweckmässiger, unter ganz gleichen Bedingungen zu experimentiren. Deshalb habe ich auch die Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen genauer so bestimmt, dass ich ausser der Peptonlösung auch die Zinksulfatlösung und das zur Ergänzung des Gesamtvolumens auf 10 ccm. benutzte destillirte Wasser zu gleichem Maasse (mit 2 ccm. verdünnter Schwefelsäure auf 100 ccm. Flüssigkeit) ansäuerte. Die Er-

under Kälte wird die Fraction IV vollständig gefällt: das klare Filtrat trübt sich durch Zusatz einiger Tropfen Eisessig nicht mehr. Wenn man eine neutrale 20%ige Peptonlösung anwendet, so kann man die oberen Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen genau feststellen: die erste Fraction wird durch 0,18—0,21-Sättigung, die zweite durch 0,42- bis 0,52-Sättigung gefällt.

gebnisse dieser Versuche sind nachstehend kurz zusammengefasst.

Fractionen	1% Peptonlösung		2% Peptonlösung				3% Peptonlösung		4% Peptonlösung			
	alles sauer ¹⁾		neutr.		sauer ²⁾		alles sauer ¹⁾		alles sauer ¹⁾			
	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere		
	Fällungsgrenze		Fällungsgrenze		Fällungsgrenze		Fällungsgrenze		Fällungsgrenze		Fällungsgrenze	
I	0,3	0,46	0,46	0,56	0,44	0,56	0,3	0,46	0,26	0,46	0,24	0,46
Ia	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
II	0,58	0,66	—	—	—	—	0,58	0,64	0,58	0,64	0,56	0,62
III	0,76	0,86	—	—	—	—	0,76	0,82	0,72	0,82	0,68	0,72
IV	0,88	Sättig.	—	—	—	—	0,86	Sättig.	0,84	Sättig.	0,8	Sättig.
Die Ausfällung ist	vollständig ³⁾		—	—	—	—	vollständig		vollständig		vollständig	

Fractionen	5% Peptonlösung			10% Peptonlösung			20% Peptonlösung									
	neutr.		sauer ²⁾	alles sauer ¹⁾		neutr.		sauer ²⁾	alles sauer ¹⁾							
	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere						
	Fällungsgrenze		Fällungsgrenze		Fällungsgrenze		Fällungsgrenze		Fällungsgrenze		Fällungsgrenze					
I	0,46	0,58	0,3	0,48	0,24	0,46	0,36	0,54	0,24	0,5	0,32	0,6	0,2	0,54	0,2	0,54
Ia	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,4	0,56	0,38	0,54
II	0,58	0,74	0,54	0,62	0,52	0,6	—	—	—	—	0,58	0,68	0,52	0,68	0,46	0,62
III	0,66	0,88	0,72	0,88	0,62	0,72	—	—	—	—	0,66	0,88	0,68	0,82	0,62	0,72
IV	—	Sättig.	—	Sättig.	0,74	Sättig.	—	—	—	—	—	Sättig.	—	Sättig.	0,74	Sättig.
Die Ausfällung ist	unvollständ. ⁴⁾		vollständig		vollständig		—	—	—	—	unvollständig		vollständig		vollständig	

Aus dieser Tabelle ergeben sich einige bemerkenswerthe Thatsachen. Zuerst sehen wir, dass, wenn man die Peptonlösung allein ansäuert, man die Fällungsgrenzen der Fraction I (insbesondere die untere) bedeutend und die der Fraction II

- 1) Peptonlösung, Salzlösung und Wasser angesäuert.
- 2) Bloss die Peptonlösung angesäuert.
- 3) Das Filtrat enthält keine Albumosen mehr.
- 4) Es bleiben ungefällte Albumosen zurück.

ein wenig herabsetzt, während die der anderen Fractionen sich kaum verändern. Säuert man aber alle Flüssigkeiten an (Pepton, Salz, Wasser), so werden die unteren und oberen Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen bedeutend herabgesetzt. Was den Einfluss der Concentration betrifft, so ist er ähnlich dem bei den neutralen Peptonlösungen beobachteten. Die untere Fällungsgrenze sinkt für alle Fractionen, wenn die Concentration der Peptonlösung höher wird; die obere Fällungsgrenze bleibt constant für die Fraction I, wird etwas niedriger für die Fraction II und erheblich niedriger für die Fraction III.

Der grosse Vortheil der fractionirten Fällung mittelst Ammonsulfats besteht darin, dass die Fällungsgrenzen der verschiedenen Albumosen genügend weit von einander liegen, um deren bequeme Trennung zu ermöglichen. Wie schon bemerkt, ist dies bei Anwendung von Zinksulfat in neutralen Witter-Peptonlösungen nicht der Fall. Mit sauren Peptonlösungen von schwacher Concentration (1—5%) gelingt jedoch die Trennung der verschiedenen Fractionen durch die kaltgesättigte Zinksulfatlösung (ob sie angesäuert ist oder nicht), ebenso leicht wie durch Ammonsulfat. Um gut filtrirende Flüssigkeiten zu erhalten, ist es nöthig, die Proben so lange stehen zu lassen, bis die auf Zusatz von Zinksulfat zuerst aufgetretene Trübung sich in Flocken absetzt.

Ich erlaube mir hier auf die auffallende Aehnlichkeit der Ergebnisse aufmerksam zu machen, die man mit den verschiedenen Salzen, die bis jetzt zur fractionirten Fällung der Albumosen verwendet worden sind, Ammonsulfat, Zinksulfat, Kaliumacetat, erhalten hat. Wenn auch die Fällungsgrenzen andere sind, so ergibt sich doch stets dieselbe Anzahl Fractionen.

Pick hatte übrigens auch beobachtet, dass zwischen den Fractionen I und II sehr wahrscheinlich eine Zwischenfraction besteht. Durch Zinksulfatfällung konnte ich unter besonderen Concentrations- und Reactionsbedingungen diese Fraction schärfer bestimmen. Ich will sie vorläufig Fraction Ia nennen. Bei der Bestimmung der oberen Fällungsgrenze der Fraction I in einer sauren 20%igen Peptonlösung hatte ich bei den durch Zusatz

von 0,2 ccm. der kaltgesättigten Zinksulfatlösung zu den klaren Filtraten entstehenden Trübungen Unregelmässigkeiten bemerkt. Die sehr deutlich entstandenen Trübungen nahmen erst zu, um nachher abzunehmen und in der 0,38- gesättigten Probe als eine sehr leichte Opalescenz ihr Minimum zu erreichen. Bei den nachfolgenden Proben wurde die Opalescenz erst stärker, verminderte sich nachher wieder und fehlte in der 0,52 gesättigten Probe ganz. Die von Anfang an sichtbaren Opalescenzen wurden nach $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde ein wenig stärker. Ich habe diese Beobachtung stets gemacht, so oft ich den Versuch mit der sauren 20%igen Peptonlösung wiederholte, gleichviel ob die Zinksulfatlösung und das Wasser angesäuert waren oder nicht. Auch fand Pick schon früher Nachtrübungen, die von der oberen Fällungsgrenze der Fraction I, nämlich 4,4 ccm. Ammonsulfatgehalt ab bis zu einem Ammonsulfatgehalt von 5,4 bis 6 ccm. auftreten. Es schien mir möglich, dass es sich um eine Zwischenfraction handelte, deren Fällungsgrenzen mit denen der Fractionen I und II zum Theile in einander greifen. Diese Vermuthung fand in nachfolgendem Versuch ihre Bestätigung:

0,45 gesättigtes 20%iges saures Peptonfiltrat ccm.	Wasser ccm.	Zink-sulfat-lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrates gegen 0,2 ccm. Zink-sulfatlösung	Bemerkungen
3,6 (2)	4,4	2 (3,6)	keine Trübung	—	
3,6 (2)	4,2	2,2 (3,8)		—	
3,6 (2)	4	2,4 (4)	Fällung	—	Unt. Fällungsgrenze
3,6 (2)	3,8	2,6 (4,2)		Opalescenz	der Fraction Ia.
3,6 (2)	3,6	2,8 (4,4)		>	
3,6 (2)	3,4	3 (4,6)		>	
3,6 (2)	3,2	3,2 (4,8)		>	
3,6 (2)	3	3,4 (5)		>	
3,6 (2)	2,8	3,6 (5,2)		>	
3,6 (2)	2,6	3,8 (5,4)		>	
3,6 (2)	2,4	4 (5,6)		klar	Ob. Fällungsgrenze
3,6 (2)	2,2	4,2 (5,8)		>	der Fraction Ia.
3,6 (2)	2	4,4 (6)		>	

Aus dieser Versuchsreihe, die mehrfach wiederholt wurde, geht hervor, dass die Fraction Ia in sauren 20%igen Peptonlösungen durch Zinksulfat bereits, ehe die Fraction I vollständig abgeschieden ist, zu fallen beginnt und auch in die Fraction II eingreift.

Hieraus ergibt sich eine geringe Unsicherheit der Fällungsgrenzen bei der einschlägigen Concentration. Es ist möglich, dass wir deshalb eine etwas zu hohe obere Fällungsgrenze für die Fraction I finden, da ja stets ein Theil der Fraction Ia mitgefällt wird; vielleicht ist auch die obere Grenze der Fraction Ia zu hoch angenommen.

Weder aus sauren Peptonlösungen geringerer Concentration (2 und 5%) noch aus neutralen Lösungen (selbst zu 20%) konnten wir die Fraction Ia isoliren. Bei der fractionirten Fällung von Peptonlösungen verschiedener Concentration und Reaction durch Kaliumacetat oder Ammonsulfat sind wir nicht glücklicher gewesen. Die Fraction Ia kann daher nur in sehr kleinen Mengen im Witte-Pepton enthalten sein und wird für gewöhnlich entweder mit der Fraction I oder mit dieser und der Fraction II zusammen gefällt.

II. Charakterisirung der einzelnen Fractionen.

Ich habe weiter versucht, die charakteristischen Eigenschaften der einzelnen Substanzen, die man durch die fractionirte Fällung mittelst Zinksulfats erhält, festzustellen. Zu diesem Zwecke habe ich die einzelnen Fractionen aus einer, wie früher erwähnt, angesäuerten 20%igen Witte-Peptonlösung dargestellt. Um eine genügende Menge der Fraction Ia zu erhalten, musste ich eine grössere Menge Pepton verwenden.

300 gr. Pepton wurden in 1500 gr. Wasser gelöst. Die Lösung wurde abfiltrirt, genau neutralisirt, mit 2 ccm. verdünnter Schwefelsäure auf 100 ccm. Flüssigkeit angesäuert und dann wieder abfiltrirt. Das Filtrat wurde durch eine genügende Menge der kaltgesättigten Zinksulfatlösung zu 0,45 gesättigt und dann nach 24 Stunden abfiltrirt. Auf diese Weise erhielt ich einen Niederschlag, welcher der Fraction I entspricht. Diese Fraction wurde mit einer 0,45-gesättigten Zinksulfatlösung gewaschen

und nun wiederholt in Wasser gelöst, in gleicher Weise gefällt und ausgewaschen, endlich sorgfältig getrocknet. Ich bereitete eine 5^oige wässrige Lösung der so gereinigten Fraction I und liess einen Theil während 10 Tagen dialysiren. Dabei blieb ein Antheil der gelösten Substanz in Lösung, während der andere ausfiel: es sind dies Kühne's Protalbumose und Heteroalbumose.

Der durch Dialyse gewonnene Niederschlag wird in heissem Wasser gelöst, wobei ein grosser Theil als gelbe schmierige Masse (sogenannte Dysalbumose) zurückbleibt. Aus der abfiltrirten Flüssigkeit wird durch kaltgesättigte angesäuerte Zinksulfatlösung die Heteroalbumose wieder ausgefällt. Der so gewonnene weisse pulverige Niederschlag wird mit 96^oigen Alkohol gewaschen und dann in Wasser gelöst.

Zu dem bei der Dialyse in Lösung gebliebenen Theil fügt man das gleiche Volumen 96^oigen Alkohols hinzu, wodurch der Rest der Heteroalbumose in Gestalt eines reichlichen Niederschlags erhalten wird. Die abfiltrirte alkoholische Flüssigkeit wird auf dem Wasserbad eingedampft, der Rückstand, die Protalbumose enthaltend, wieder in Wasser aufgelöst, neuerlich mit dem gleichen Volumen 96^oigen Alkohols versetzt, wodurch neuerdings etwas Heteroalbumose gefällt wird, das Filtrat dann noch mehrere Male in gleicher Weise behandelt, bis die wässrige Protalbumoselösung bei Zusatz des gleichen Volumens 96^oigen Alkohols keine Spuren Heteroalbumose mehr ausfallen lässt. Dieses Verfahren zur Reinigung der Protalbumose gründet sich auf Erfahrungen von Herrn Dr. E. P. Pick, über welche dieser in nächster Zeit selbst berichten wird.

Zu dem nicht dialysirten Theil der Fraction I setzt man das gleiche Volumen 96^oigen Alkohols hinzu, wodurch man einen reichlichen weissen, nur zum Theile in Wasser löslichen Niederschlag erhält, der ein Gemisch von Dysalbumose, Heteroalbumose und Zinksulfat darstellt. Das Filtrat, welches Protalbumose neben wenig Heteroalbumose enthält, wird von der letzteren nach dem eben mitgetheilten Verfahren befreit.

Um die Fraction Ia zu gewinnen, setzt man zu dem

durch Fällung der Fraction I erhaltenen Filtrate 22²/₉ seines Volums an kaltgesättigter Zinksulfatlösung hinzu, so dass man ein 0,55-gesättigtes Gemisch bekommt. Der erzielte Niederschlag wird mit einer 0,55-gesättigten Zinksulfatlösung gewaschen, dann durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit Zinksulfatlösung der angeführten Concentration von anhängenden Resten der Fractionen I und II gänzlich befreit, endlich sorgfältig getrocknet.

Um die Fractionen II und III zu isoliren, setzt man den Filtraten der Fractionen Ia und II ¹/₂ respective 1¹/₂ Volume der kaltgesättigten Zinksulfatlösung hinzu, so dass man 0,7- und 0,88-gesättigte Lösungen erhält. Um die Fraction IV zu fällen, sättigt man das Filtrat der Fraction III mit feingepulvertem Zinksulfat. Die Fractionen II, III und IV werden auf dieselbe Weise wie die Fraction Ia gereinigt. Ich habe die verschiedenen Niederschläge immer in der Anfangs benutzten Wassermenge (1500 ccm.) gelöst und mit 2 ccm. Säure auf 100 ccm. Flüssigkeit angesäuert. So war stets die anfängliche Concentration wiederhergestellt und damit eine Veränderung der Fällungsgrenzen bei den verschiedenen Fractionen vermieden.

Das nach der Fällung der Fraction IV verbleibende klare Filtrat trübt sich durch Zusatz von Zinksulfat nicht mehr. Es enthält keine Albumosen mehr, gibt aber noch eine charakteristische Biuretreaction. Durch Fällung eines Theiles dieses Filtrates nach dem Vorgehen von Pick mit einer zinksulfat-gesättigten Lugol'schen Flüssigkeit kann man daraus zwei Körper, einen alkoholunlöslichen und einen alkohollöslichen, isoliren. Um diese zwei Fractionen zu trennen, habe ich ein Verfahren benutzt, das die Nachtheile der Fällung durch Jodjodkaliumlösung vermeidet.

Das Filtrat wird durch Zusatz von feingepulvertem Zinkoxyd neutralisirt, dann auf dem Wasserbad zu einem kleinen Volum eingedampft und nach 24stündigem Stehen von dem reichlichen krystallinischen Niederschlag abfiltrirt. Das klare Filtrat gibt die Biuretreaction, enthält aber noch immer Zinksalz. Man erwärmt es auf dem Wasserbad, fügt ein Volum 96^o ige Alkohols hinzu und erhält so neuerlich einen Nieder-

schlag, den man von dem in Alkohol gelösten Theile abfiltrirt. Dieser Niederschlag wird in Wasser gelöst und wiederholt mit Alkohol ausgezogen. Auf diese Weise trennt man das Filtrat von der Fraction IV in einen alkoholunlöslichen und einen alkohollöslichen Theil.

Zu dem in Wasser gelösten alkoholunlöslichen Niederschlag (Fraction V) setzt man tropfenweise Ammoniak hinzu, bis in der überstehenden Flüssigkeit kein Niederschlag mehr erfolgt. Das Filtrat gibt allein die Biuretreaction. Durch Zusatz von feingepulvertem Chlorbaryum wird es von Schwefelsäure befreit. Fügt man zu dem neuen so gewonnenen Filtrate 5 bis 6 Volumen 96^o/oigen Alkohols hinzu, so erhält man die Fraction V als einen weissen, flockigen Niederschlag, den man durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen durch Alkohol reinigt und endlich sorgfältig trocknet.

Der alkohollösliche Theil (Fraction VI) wird durch wiederholtes Abdampfen auf dem Wasserbad, Lösen in Wasser und Fällen mit 96^o/oigem Alkohol von zurückgehaltenem Zinksalz gereinigt und endlich sorgfältig getrocknet.

In der nachfolgenden Tabelle (s. Seite 240 uff.) theile ich die Reactionen mit, welche die wässerigen 5^o/oigen Lösungen der verschiedenen, durch die fractionirte Fällung mittelst Zinksulfats aus dem Witte-Pepton isolirten Körper darboten.

Die Fractionen Ia, II, III und IV enthielten Spuren von Zinksulfat, während die anderen davon gänzlich frei waren. Da Zinksulfat mit Ferrocyankalium und starkem Alkohol Niederschläge gibt, musste darauf Bedacht genommen werden, dass seine Anwesenheit die betreffenden Reactionen stören konnte. Doch war der Gehalt daran so gering, dass er sich nur bei der Probe mit Ferrocyankalium geltend machte. Ich bin daher nicht in der Lage, über das Verhalten der betreffenden Fractionen gegen dieses Reagens zu berichten.

Die Heteroalbumose ist schwer in Wasser löslich und gibt, wie bekannt, keine ganz klaren Lösungen.

Aus dieser Tabelle erhellen verschiedene beachtenswerthe Thatsachen.

Vorerst entsprechen die Fractionen II, III, IV und V den Deuteroalbumosen A, B, C und dem Pepton A von Pick. Es scheint mir derzeit nicht berechtigt, den geringen Unter-

schieden, welche die Deuteroalbumosen A, B, C meiner Darstellung bei Prüfung mit Trichloressigsäure den Angaben Pick's gegenüber aufweisen, Gewicht beizulegen, zumal durch die angewandte Darstellungsmethode die Reinheit der einzelnen Albumosen trotz aller Bemühungen nicht soweit verbürgt erscheint, um jede Spur von fremden Beimengungen auszuschliessen.

Die Fraction Ia zeigt im grossen Ganzen die Reactionen der Deuteroalbumose A. Sie scheint sich jedoch den primären Albumosen zu nähern, wie dies die mit Kupferacetat,¹⁾ Trichloressigsäure, Jodquecksilberkalium²⁾ und Bleiacetat erhaltenen Reactionen anzeigen. Andererseits verhält sie sich gegenüber verdünntem Kupfersulfat wie die secundären Albumosen B und C, während die Deuteroalbumose A in diesem Falle ein den primären Albumosen entsprechendes Verhalten zeigt. Zu beachten ist, dass ich leider die Fraction Ia in zu geringer Menge erhielt, um sie gänzlich von anhaftenden Resten, sowohl der primären Albumosen als der Deuteroalbumose A, befreien zu können. Wie dem auch sei, sehe ich mich doch im Hinblick auf die Fällungsgrenzen und die oben angeführten Reactionen genöthigt, diese Fraction als eine mit der Deuteroalbumose A nicht identische Substanz anzusehen. Ich schlage vor, sie vorläufig als Deuteroalbumose A α und die Deuteroalbumose A von Pick als Deuteroalbumose A β zu bezeichnen.

Die Fraction VI gibt genau dieselben Reactionen wie das Pepton B von Pick. Jedoch unterscheidet sie sich davon durch den positiven Ausfall der Millon'schen und der Xanthoproteinreaction. Sie gibt mit Bromwasser einen reichlichen Niederschlag.

Aus Vorstehendem geht hervor, dass man durch die fractionirte Fällung des Witte-Peptons mittelst Zinksulfats dieselben Fractionen erhält wie durch fractionirte Fällung dieses Körpers mittelst Ammonsulfats. In beiden Fällen erzielt man eine ziemlich beträchtliche Ausbeute an primären Albumosen

1. Die gleiche Reaction, welche die Heteroalbumose gibt.

2. Die gleiche Reaction, welche die Protalbumose gibt.

Reagens	Fraction I		Fraction Ia
	Heteroalbumose	Protalbumose	Deuteroalbumose A α
1. Alkohol 96 ^o / _o .	Mit dem gleichen Volumen Fällung, die sich in der Hitze nicht verändert.	Bei grossem Ueberschuss Opalescenz; in der Hitze Flockenabscheidung.	Fällung; in der Hitze Flockenabscheidung.
2. Salpetersäure in der Kälte.	Trübung, welche in der Hitze verschwindet, in der Kälte wieder erscheint.	Erst bei Kochsalzzusatz Trübung.	Leichte Trübung, viel deutlicher bei Kochsalzzusatz.
3. Gleiches Volum concentrirter Kochsalzlösung zu der mit Essigsäure angesäuerten Lösung gesetzt.	Starke Trübung, die beim Erhitzen verschwindet.	Opalescenz, die beim Erhitzen verschwindet, beim Abkühlen wieder erscheint.	Starke Trübung; nach einigem Stehen weisser Niederschlag.
4. Aussalzen der neutralen Lösung mit Kochsalz.	Opalescenz und Fällung.	Opalescenz und Fällung.	Opalescenz und Fällung.
5. Aussalzen der mit Essigsäure angesäuerten Lösung mit Kochsalz.	Starke Fällung, im Filtrate auf Zusatz von Zinksulfat Trübung.	Starke Fällung, im Filtrate auf Zusatz von Zinksulfat keine Trübung.	Starke Fällung, im Filtrate auf Zusatz von Zinksulfat starke Trübung.
6. Verdünnte Kupfersulfatlösung.	Starke Fällung.	Kaum eine Andeutung von Trübung.	Klar, selbst bei neutraler Reaction und nach längerem Stehen.
7. Verdünnte Kupferacetatlösung.	Starke Fällung.	Sehr leichte Trübung.	Starke Fällung.
8. Essigsäure-Ferrocyankalium.	Starke Fällung, in der Hitze löslich, beim Abkühlen wieder auftretend.	Starke Fällung, in der Hitze löslich, beim Abkühlen wieder auftretend.	
9. Trichloressigsäure.	Sehr leichte Trübung, in der Hitze verschwindend, in der Kälte wieder erscheinend.	Kaum eine Andeutung von Trübung.	Leichte Trübung.

Fraction II	Fraction III	Fraction IV	Fraction V	Fraction VI
Deuteroalbumose A β	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Pepton A	
Fällung; in der Hitze Flockenabscheidung.	Bei grossem Ueberschuss Opalescenz, die sich in der Hitze nicht verändert.	Bei grossem Ueberschuss starke Opalescenz; in der Hitze Flockenabscheidung.	Fällt im Ueberschusse.	Bei grossem Ueberschuss Trübung, die sich in der Hitze nicht verändert; nach längerem Stehen gelbe Ausscheidung.
Erst bei Kochsalzzusatz, beinahe bis zur Sättigung, Trübung.	Erst bei Kochsalzsättigung Trübung.	Selbst bei Kochsalzsättigung keine Trübung.	Selbst bei Kochsalzsättigung keine Trübung.	Selbst bei Kochsalzsättigung keine Trübung.
Starke Trübung; nach einigem Stehen weisser Niederschlag.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Opalescenz und Fällung.	Leichte Opalescenz.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Starke Fällung; im Filtrate auf Zusatz von Zinksulfat starke Trübung.	Fällung u. leichte Opalescenz; im Filtrate auf Zusatz von Zinksulfat starke Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Klar, bei neutraler Reaction nach längerem Stehen Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
			Keine Trübung.	Leichte Fällung.
Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.

Reagens	Fraction I		Fraction Ia	Fraction II	Fraction III	Fraction IV	Fraction V	Fraction VI
	Heteroalbumose	Protoalbumose	Deuteroalbumose A α	Deuteroalbumose A β	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Pepton A	
10. Almén'sche Reaction.	Starker Niederschlag, der sich nicht im Ueberschusse löst.	Trübung; nach längerem Stehen geringer Niederschlag, der sich im Ueberschusse löst.		Starker Niederschlag, der sich nicht im Ueberschusse löst.	Trübung; nach längerem Stehen Niederschlag, der sich nicht im Ueberschusse löst.	Trübung; nach längerem Stehen Niederschlag, der sich nicht im Ueberschusse löst.	Trübung, sich beim Erwärmen lösend, beim Abkühlen wieder ausfallend; nach längerem Stehen Niederschlag, der sich im Ueberschusse löst.	Starke Fällung, die sich im Ueberschusse löst.
11. Jodquecksilberkalium.	Erst in saurer Lösung Trübung, die sich im grossen Ueberschuss von Salzsäure nicht löst.	1 Tropfen gibt starken Niederschlag, der sich im grossen Ueberschuss von Salzsäure fast gänzlich löst.	1 Tropfen gibt starken Niederschlag, der sich im grossen Ueberschuss von Salzsäure theilweise löst.	1 Tropfen gibt einen starken Niederschlag, der sich im grossen Ueberschuss von Salzsäure nicht löst.	Sehr starke Fällung; in grossem Ueberschuss von Salzsäure löslich.	Starke Fällung; in geringem Ueberschuss von Salzsäure löslich.	Starke Fällung, die sich in Salzsäure sehr leicht löst.	1 Tropfen gibt einen starken Niederschlag, der sich in Salzsäure sehr leicht löst.
12. Millon'sche Reaction.	Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.	Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.	Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.	Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.	Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.	Fällung, beim Kochen Rothfärbung.	Sehr schwache, beinahe keine Trübung; bei längerem Kochen blasse Rosafärbung.	Sehr schöne Rothfärbung.
13. Xanthoproteinprobe.	Erst beim Erhitzen Gelbfärbung	Schon in der Kälte Gelbfärbung.	Schon in der Kälte Gelbfärbung.	Schon in der Kälte Gelbfärbung.	Schon in der Kälte Gelbfärbung.	Schon in der Kälte Gelbfärbung.	Beim Kochen sehr schwache Gelbfärbung.	Schon in der Kälte Gelbfärbung.
14. Adamkiewicz'sche Reaction.	Violett färbung.	Violett färbung.	Violett färbung.	Violett färbung.	Violett färbung.	Violett färbung.	Rothfärbung.	Negativ.
15. Molisch'sche Zuckerprobe.	Schwach positiv.	Schwach positiv.	Positiv.	Positiv.	Positiv.	Positiv.	Sehr schöne karminrothe Färbung.	Negativ.
16. Biuretprobe mit Kupfersulfat.	Positiv.	Positiv.	Positiv.	Positiv.	Positiv.	Positiv.	Positiv.	Positiv.
17. Biuretprobe mit Nickelsulfat.	Gelbfärbung.	Beim Erwärmen Gelbfärbung.	Schöne Gelbfärbung.	Schöne Gelbfärbung.	Gelbfärbung.	Beim Erwärmen Gelbfärbung.	Schwache Gelbfärbung.	Gelbfärbung.
18. Kochen mit Alkali und Bleiacetat.	Schwache Braunfärbung.	Schwache Braunfärbung.	Braunfärbung.	Intensive schwarzbraune Färbung.	Nach kurzem Kochen Braungelbfärbung, später geringe Ausscheidung von Schwefelblei.	Selbst nach längerem Kochen negativ.	Selbst nach längerem Kochen negativ.	Selbst nach längerem Kochen negativ.

und an Deuteroalbumose B, eine viel geringere an Deuteroalbumose A β und eine sehr kleine an Deuteroalbumose C. Ausserdem lässt sich mittelst Zinksulfats noch eine weitere Fraction, die Deuteroalbumose A α , wovon jedoch nur eine minimale Menge in dem Witte-Pepton enthalten ist, isoliren. Das Gemisch der Deuteroalbumosen besteht demnach aus wenigstens vier verschiedenen Körpern.

Wenden wir uns jetzt wieder zu den primären Albumosen. Durch das oben mitgetheilte, im Wesentlichen von E. P. Pick ausgearbeitete Verfahren habe ich sehr reine Heteroalbumose und Protalbumose gewinnen können. Diese beiden Körper weisen in ihrem Verhalten gegen Alkohol, kalte und kochende Salpetersäure, Sättigung mit Chlornatrium, gegen verdünntes Kupfersulfat und Kupferacetat, Jodquecksilberkalium und das Almén'schen Reagens wesentliche Unterschiede auf. Dabei sind drei Momente besonders beachtenswerth.

Vorerst gibt die Heteroalbumose auf Hinzufügung einiger Tropfen verdünnter Salpetersäure in der Kälte eine recht deutliche Trübung, während die Protalbumosenlösung vollständig klar bleibt. Ich glaube annehmen zu dürfen, dass die unter gleichen Bedingungen sonst in Protalbumosenlösungen erhaltenen Trübungen einzig von dem Vorhandensein einer kleinen Menge von darin enthaltener Heteroalbumose herrühren. Was diese Meinung unterstützt, ist die Angabe Folin's,¹⁾ betreffend eine Albumose, deren Lösung in der Kälte nicht durch Salpetersäure getrübt würde, obgleich sie sonst die der Protalbumose eigenthümlichen Reactionen aufwies.

Eine zweite Thatsache, auf die ich die Aufmerksamkeit lenken möchte, ist, dass, während in Heteroalbumosenlösung ein einziger Tropfen verdünnter Kupfersulfat- oder Kupferacetatlösung sofort einen reichlichen Niederschlag bewirkt, Protalbumosenlösung sich nach Zusatz von mehreren Tropfen dieser Reagentien nur sehr wenig trübt. Wenn man zu einer neutralen 5%igen Witte-Peptonlösung tropfenweise eine verdünnte

1) Otto Folin. Ueber einige Bestandtheile von Witte's Pepton. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXV. 1898. S. 152.

Kupfersulfatlösung so lange zusetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht, so gibt das nach 24stündigem Stehen erzielte klare blaugefärbte Filtrat auf Zusatz eines gleichen Volumens der kaltgesättigten Zinksulfatlösung noch einen sehr reichlichen Niederschlag. Ein gleiches Ergebniss wird erzielt, wenn man sich für denselben Versuch einer verdünnten Kupferacetatlösung bedient. Demnach fällt die verdünnte Kupfersulfat- und Kupferacetatlösung nur die Heteroalbumose ausgiebig.¹⁾ Aehnlich lässt sich zeigen, dass die verdünnte Kupfersulfatlösung die Deuteroalbumose $A\beta$ aus neutraler Lösung vollständig fällt, nicht aber die Deuteroalbumosen B und C.

Endlich ist das Verhalten der beiden primären Albumosen gegenüber dem Almén'schen Reagens sehr bemerkenswerth. Während die Protalbumose sich dabei wie die echten Peptone verhält, d. h. einen im Ueberschuss des Reagens löslichen Niederschlag liefert, zeigt die Heteroalbumose dieselbe Reaction wie die Deuteroalbumosen. Folin ist der einzige Autor, der bis jetzt eine primäre Albumose erhielt, welche mit dem Almén'schen Reagens wie die echten Peptone reagierte.²⁾ Das scheint zu ergeben, dass der Körper, den Folin in sehr kleinen Mengen aus Witte-Pepton nach Ausdialysiren der Heteroalbumose und Ausfällung durch Bleiacetat erhielt, hauptsächlich aus sehr reiner Protalbumose bestand. Warum der relativ alkohollösliche Theil der primären Albumosen der Protalbumose Kühne's gleichzusetzen ist, wird von Herrn Dr. E. P. Pick näher auseinandergesetzt werden.

1) Folin (l. c. S. 155) hatte schon früher gefunden, dass die primären Albumosen weder durch Kupferacetat noch durch Kupfersulfat quantitativ gefällt werden.

2) R. Neumeister, Ueber die Reactionen der Albumosen und Peptone, Zeitschr. f. Biol., N. F., Bd. 8, 1890, S. 344. — Wenn man einer Lösung «echten» Peptons einen Tropfen des Almén'schen Reagens zusetzt, so trübt sich die Flüssigkeit. Nach 24stündigem Stehen hat sich ein leichter Niederschlag gebildet, der sich im Ueberschusse des Reagens auflöst. Der bei den Deuteroalbumosen erhaltene Niederschlag löst sich nicht im Ueberschusse des Reagens auf.

III. Die Fällungsgrenzen der peptischen Verdauungsprodukte des krystallinischen Eier- und Serumalbumins, des Serumglobulins und des Caseins bei Verwendung von Zinksulfat.

Umber¹⁾ hat es versucht, mit Hülfe von Ammonsulfat die Trennung der Albumosen des krystallisirten Eier- und Serumalbumins und des Serumglobulins, Alexander²⁾ jene der Albumosen des Caseins durchzuführen. Sie erhielten dabei für jeden der genannten Eiweisskörper 4 Fractionen, entsprechend dem Gemenge der primären Albumosen und den 3 secundären Albumosen von E. P. Pick.

Es war nach den Erfahrungen am Witte-Pepton zu erwarten, dass das Zinksulfat auch in diesen Fällen das Ammonsulfat zu ersetzen vermöchte.

Zu diesem Zwecke stellte ich mir krystallisirtes Eieralbumin nach Hofmeister³⁾, krystallisirtes Serumalbumin nach Gürber,⁴⁾ Serumglobulin nach Kauder⁵⁾ und Reye⁶⁾ dar.

1) F. Umber, Die Spaltung des krystallinischen Eier- und Serumalbumins, sowie des Serumglobulins durch Pepsinverdauung. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV. 1898, S. 258.

2) F. Alexander, Zur Kenntniss des Caseins und seiner peptischen Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV. 1898, S. 411.

3) F. Hofmeister, Ueber jodirtes Eieralbumin. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV. 1897, S. 159.

Meine Versuche, krystallisirtes Eieralbumin nach dem Verfahren von Hopkins (F. G. Hopkins and S. N. Pinkus, Observations on the crystallization of animal proteids. Journal of Physiology, Vol. XXIII, 10. Juni 1898, Nr. 1—2) darzustellen, verliefen nicht ganz nach Wunsch. Zwar gelang es stets schon nach 24 Stunden einen reichlichen krystallinischen Niederschlag, nur mit spärlichen amorphen Beimengungen verunreinigt, zu erhalten. Wurde er aber nicht sofort abfiltrirt, so verlor er seine Löslichkeit, so dass eine weitere Reinigung durch Umkrystallisiren nicht durchführbar war. Aber auch wenn man die erhaltenen schönen Krystalle möglichst bald wieder löste und umkrystallisiren versuchte, kam es vor, dass die Krystallisation ausblieb und selbst auf Zusatz von vorrätzig gehaltenen Krystallen nicht mehr eintrat.

4) Gürber, Krystallisation des Serumalbumins. Sitzungsber. d. physik. med. Ges. z. Würzburg, 1894.

5) Kauder, l. c.

6) Reye, l. c.

Reines, nach Hammarsten's ¹⁾ Vorschrift bereitetes Casein lieferte mir Merck in Darmstadt.

Die reinen Eiweisskörper wurden in 2%igen Lösungen der Einwirkung von 0,4%iger concentrirter Salzsäure und von Grübler's Pepsinum purissimum (0,05 gr. auf 10 ccm.) bei 38—40° überlassen. Sie gingen rasch in Lösung; nur das Eieralbumin und das Serumglobulin hinterliessen einen geringen flockigen Niederschlag. Die Verdauung wurde unterbrochen, sobald an abgenommenen Proben, nach Sättigung mit Zinksulfat die Anwesenheit von Peptonen nachweisbar war. Dann wurde das Filtrat sorgfältig mit verdünnter Natronlauge neutralisirt ²⁾ und nachher mit verdünnter Schwefelsäure in oben angegebener Weise (2 ccm. auf 100 ccm.) angesäuert. An den völlig klaren Lösungen wurden, die Fällungsgrenzen mit angesäuerter Zinksulfatlösung, wie oben beschrieben, genau bestimmt. Das Ergebniss der Versuche ist aus nachstehender Tabelle ersichtlich. Die Zahlen geben den Grad der Sättigung mit Zinksulfat an, die Concentration der kaltgesättigten Lösung gleich eins gesetzt.

Fractionen	kryst. Eiereiweiss		kryst. Serumweiß		Serumglobulin		Casein	
	untere Fällungsgrenze	obere Fällungsgrenze						
primäre Albumosen	0,24	0,46	0,24	0,48	0,26	0,46	0,28	0,44
Deuteroalbumose A	0,64	0,68	0,52	0,60	0,58	0,72	0,54	0,66
B	0,72	0,82	0,72	0,82	0,74	0,84	0,74	0,84
C	0,84	Sättig.	0,88	Sättig.	0,88	Sättig.	0,90	Sättig.

Wie die Tabelle lehrt, gelingt mit Hilfe von Zinksulfat in allen Fällen die Trennung von 4 Fractionen ebenso leicht, wie mittelst Ammonsulfat.

Umber und Alexander haben in den Fällungsgrenzen gegen Ammonsulfat für bestimmte Albumosen des Globulins und

1) O. Hammarsten, Verhandlungen der kgl. schwed. Akad. der Wissenschaften. Upsala 1877.

2) Die Verdauung dauerte in allen Fällen so lange, bis kein Neutralisationspräcipitat mehr erhalten wurde.

des Caseins kleine Abweichungen gegenüber den Albumosen des Fibrins (Witte-Pepton) gefunden. Solche Unterschiede treten zum Theil auch bei Verwendung von Zinksulfat hervor. Wie Umber mit Ammonsulfat, habe ich auch mit Zinksulfat die Fällungsgrenzen der secundären Albumose A des Globulins höher gefunden als bei der entsprechenden Fraction des Witte-Pepton, während ich Aehnliches bei der gleichen Fraction am Casein nicht sicherstellen konnte. Dagegen fand ich auch für die secundäre Albumose A aus Eieralbumin höhere Fällungsgrenzen, näher denen des Globulins, was Umber bei seinem Verfahren nicht bemerkte. Es wäre von Bedeutung, festzustellen, ob diese Unterschiede von der Quantität der betreffenden Albumose abhängig sind oder von deren abweichender chemischen Beschaffenheit. Dann ist aber auch an die Möglichkeit zu denken, dass eine Zwischenfraction, der von mir am Witte-Pepton isolirten Deuteroalbumose A_a entsprechend, je nach der Menge in der sie auftritt, die Fällungsgrenzen beeinflusst, und dass diese Unterschiede je nach dem Stadium der Verdauung ungleich deutlich hervortreten.

Mit Ausnahme der Deuteroalbumose A, sind die Fällungsgrenzen für die Albumosen der verschiedenen Eiweisskörper nahezu identisch.

Noch sei bemerkt, dass es nöthig war, um die untere Fällungsgrenze der ersten Fraction beim Eieralbumin und Globulin scharf zu bestimmen, die Verdauungsflüssigkeit zunächst mit saurer kaltgesättigter Zinksulfatlösung bis zu 0,1-Sättigung zu versetzen und so die Reste von Acidalbumin zu beseitigen, welche sonst mit der ersten Albumosenfraction zur Ausfällung gelangen.

Hammarsten¹⁾ hat gegen das Unterscheiden von Albumosen und Peptonen auf Grund des Verhaltens gegen ein einziges Salz, das Ammonsulfat, Bedenken erhoben. Dasselbe Bedenken kann umsomehr gegen die Unterscheidung verschiedener secundärer Albumosen, wie sie E. P. Pick, dann Umber und Alexander durchgeführt haben, erhoben werden. Allein, abgesehen davon, dass, wie schon die angeführten

1) Olof Hammarsten. Lehrbuch der physiologischen Chemie. 3. Auflage. Wiesbaden, 1895, S. 32.

Beobachter gezeigt haben, die einzelnen so isolirten Fractionen nicht bloss in den Fällungsgrenzen, sondern auch in ihren Löslichkeitsverhältnissen und Reactionen Verschiedenheiten darbieten, so lehren die vorstehenden Untersuchungen, dass sich mit Hülfe eines ganz anderen Trennungsmittels, des Zinksulfats, dieselben Fractionen, und zwar mit dem gleichen reactionellen Verhalten isoliren lassen. Hiermit erscheint die Vielheit der peptischen Verdauungsprodukte neuerdings sichergestellt und zugleich ein neuer, vielleicht bequemerer Weg zu ihrer Isolirung gegeben.

Da über die Reindarstellung, Zusammensetzung und die Spaltungsprodukte der einzelnen Albumosen ausführliche Mittheilungen von befreundeter Seite in nächster Aussicht stehen, so habe ich meine Untersuchungen nicht in dieser Richtung weiter geführt, sondern auf Anregung von Herrn Professor Hofmeister den Versuch gemacht, die Zinksulfatmethode zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Albumosen in den verschiedenen Stadien der Peptonisation zu benutzen. Die in mehrfacher Richtung überraschenden Resultate dieser Untersuchung bilden den Gegenstand einer in Kürze folgenden Mittheilung.