

Ueber die Eiweisskörper der Thymusdrüse.

Von

W. Huiskamp.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

(Der Redaction zugegangen am 17. Januar 1901.)

Der Zweck dieser Arbeit war in erster Linie, das von Lilienfeld aus der Thymusdrüse erhaltene Nucleohiston näher kennen zu lernen. Erstens kam es mir wahrscheinlich vor, dass die von Lilienfeld untersuchte Substanz nicht genügend gereinigt war. Dieselbe war mittelst Fällung des Wasserextractes der Drüse mit Essigsäure, Lösung des Niederschlages in Natriumcarbonat, nochmaliger Fällung mit Essigsäure und Auswaschen des Niederschlages mit essigsäurehaltigem Wasser, Alkohol und Aether, bereitet worden.¹⁾

Der Niederschlag enthält aber, ausser Nucleohiston, auch anderes Eiweiss, denn das von der Essigsäurefällung abfiltrirte Extract enthält kaum mehr Eiweiss, während doch, wie Lilienfeld selbst gefunden hat, die Drüse neben Nucleohiston noch ein anderes Nucleoproteid enthält, welches, wie sich nachweisen lässt, bei der Extraction mit Wasser in Lösung übergeht.

Zweitens wünschte ich den Einfluss des Nucleohistons auf die Gerinnung des Fibrinogens zu untersuchen. Die Auffassung Lilienfeld's ist nämlich in verschiedener Hinsicht im Widerspruch mit den von Pekelharing mitgetheilten Befunden.²⁾

1) Diese Zeitschr., Bd. XVIII, S. 478.

2) Untersuchungen über das Fibrinferment. Amsterdam, 1892.

Es gelang mir, eine Methode zu finden zur Trennung des Nucleohistons und des anderen Nucleoproteids, so dass ich in der Lage war, beide Stoffe genauer zu untersuchen.

Als meine Untersuchung schon beinahe beendet war, erschienen zwei Arbeiten über denselben Gegenstand, eine von Bang und eine von Malengreau. Auch diese Forscher bemerken, dass bei der Fällung des Nucleohistons mittelst Essigsäure das andere Nucleoproteid mitgefällt wird.

Bang¹⁾ kam zu dem Schluss, dass, was Nucleohiston genannt wird, eigentlich nichts Anderes ist als ein Gemenge von Nucleoproteid, Histon und Nucleinsäure, ein Schluss, welcher von Kossel²⁾ sogleich als unbegründet zurückgewiesen wurde.

Malengreau³⁾ fand, dass das Nucleoproteid aus dem Thymusextracte von Ammonsulfat früher gefällt wurde als das Nucleohiston. Er benutzte diese Eigenschaft zur Trennung des Nucleohistons vom Nucleoproteid.

Im Thymusextracte wurde mit Essigsäure ein Niederschlag hervorgerufen, welcher ausgewaschen und abfiltrirt wurde; das Filtrat enthielt noch ein wenig Eiweiss; der Niederschlag wurde mit Natriumcarbonat oder Natronlauge gelöst, wieder mit Essigsäure gefällt und diese Behandlung so oft wiederholt, bis im Filtrate kein Eiweiss mehr vorhanden war. Schliesslich wurde der Niederschlag wieder in Natriumcarbonat oder Natronlauge gelöst.

Es stellte sich alsdann heraus, dass, wenn diese Lösung zu 30—45% mit Ammonsulfat gesättigt wurde, das Nucleoproteid ausfiel, während das Nucleohiston erst, wenn die Flüssigkeit zu 56—72% mit Ammonsulfat gesättigt war, gefällt wurde.

Malengreau fand weiter, dass das Nucleoproteid bei Behandlung mit 1%iger HCl ein Histon lieferte, welches aber von dem aus Nucleohiston erhaltenen verschieden war; das Histon aus dem Nucleoproteid wurde von Ammonsulfat schon

1) Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 508.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 520.

3) La cellule, t. XVII, p. 393.

aus seiner Lösung gefällt, wenn die Flüssigkeit zu 45⁰/₀ oder noch weniger mit Ammonsulfat gesättigt war; das Histon aus Nucleohiston brauchte zur Fällung mehr Ammonsulfat; die Flüssigkeit musste wenigstens zu 55⁰/₀ mit diesem Salze gesättigt sein. Malengreau bemerkt, dass die relativen Mengen des im Thymusextracte enthaltenen Nucleoproteids und Nucleohistons nahezu gleich gross sind.

Sowohl im Nucleohiston, als im Nucleoproteid fand er Adenin und Guanin. Der Phosphorgehalt des Nucleoproteids war etwa 0,5⁰/₀, derjenige des Nucleohistons etwa 4,5⁰/₀.

Der Einfluss verdünnter Salzlösungen auf das Nucleohiston.

Wird dem mittelst Colirens und Centrifugirens von Formelementen getrennten Wasserextracte der Thymusdrüse Chlorcalciumlösung zugesetzt, so bildet sich, wenn die Menge des zugesetzten CaCl_2 richtig gewählt wird, ein ausgiebiger Niederschlag.¹⁾

Derselbe lässt sich leicht abcentrifugiren und ist in geringem Ueberschuss von Salzen, auch von CaCl_2 löslich, weniger löslich in Wasser, leicht löslich aber, obgleich mit Opalescenz, in mit so wenig Ammoniak versetztem Wasser, dass die alkalische Reaction mit Hülfe von Lackmuspapier gerade deutlich wird.

Die Menge des Calciumchlorids, mit welcher der Niederschlag so gross als möglich wird, ist 1 ccm. 10⁰/₀iges CaCl_2 auf 100 ccm. des Extractes, welches dadurch also einen Gehalt von \pm 0,1⁰/₀ an CaCl_2 erhält. Man kann aber, ohne dass sich der Niederschlag merkbar löst, CaCl_2 bis zu einem Gehalt von 0,5⁰/₀ zusetzen.

Wird weniger als 1 ccm. 10⁰/₀iges CaCl_2 auf 100 ccm. Flüssigkeit gebraucht, so bleibt die Fällung unvollständig, während, wenn der Gehalt 0,5⁰/₀ CaCl_2 übersteigt, die

1) Wo in der Folge von Thymusextract die Rede ist, wird ein Auszug gemeint, welcher aus 150—200 g vom anhängenden Fett gereinigten und feingewiegten Kalbsthymusdrüse mittelst 15—18ständiger Extraction mit 500—600 ccm. Wasser bereitet worden ist.

Fällung gleichfalls unvollständig ist, weil der Niederschlag sich in Ueberschuss von Calciumchlorid löst.

Zu untersuchen war, ob der erhaltene Niederschlag aus Nucleohiston bestand; die grosse Menge des Niederschlages und die Unlöslichkeit desselben in Essigsäure machten dies schon wahrscheinlich.

Durch Veraschung der Substanz mit KNO_3 und Na_2CO_3 wurde nachgewiesen, dass der Niederschlag Phosphor enthielt. Weiter lieferte der Niederschlag bei Behandlung mit 0,8%iger HCl (0,8 g HCl in 100 g der Lösung) in ausgiebiger Menge Histon.¹⁾

Das Nucleohiston wurde hierzu folgender Weise bereitet. Der mit CaCl_2 erhaltene Niederschlag wurde abcentrifugirt und in Wasser unter Zusatz von ein Paar Tropfen verdünnten Ammoniaks gelöst.²⁾ Dann wurde die Lösung filtrirt und wieder mit CaCl_2 gefällt, der Niederschlag abcentrifugirt, mit 0,8%iger HCl gemischt und darauf einige Stunden sich selbst überlassen. Das Nuclein bleibt dann im Niederschlage, indem das Histon sich in der Salzsäure löst.

Dass die ungelöst gebliebene Substanz thatsächlich Nuclein ist, geht daraus hervor, dass dieselbe Eiweissreactionen gibt (nur nicht die Adamkiewicz'sche Reaction), Phosphor enthält und in Säuren, auch in Essigsäure, unlöslich ist, während Purinbasen, hauptsächlich Adenin, in grosser Menge daraus zu erhalten sind. In verdünntem Ammoniak ist dieses Nuclein löslich und kann dann mittelst Essigsäure wieder gefällt werden.

1) Wie es scheint, hat Lilienfeld, obgleich er von 0,8%iger HCl spricht, eine schwächere Salzsäurelösung gebraucht. Er erwähnt wenigstens (l. c. Bd. XX, S. 114), dass er zur Spaltung des Nucleohistons dasselbe mit einer Lösung von 8 ccm. rauchender Salzsäure auf 1000 ccm. Wasser, also 0,2—0,3%iger HCl entsprechend, behandelt hat.

2) Für das Erhalten einer gut brauchbaren Lösung ist es in diesem Falle empfehlenswerth, das Nucleohiston mit möglichst wenig CaCl_2 zu fällen, da der Niederschlag sich um so besser in Wasser löst, je weniger CaCl_2 er enthält; ich habe deshalb nur soviel Calciumchlorid zugesetzt, dass die Flüssigkeit davon 0,1% enthielt, was für eine vollständige Fällung ausreicht.

Das Histon ist, wie gesagt, in der Salzsäure gelöst; mittelst Ammoniak kann es daraus nur sehr unvollständig ausgefällt werden, viel besser aber, wenn die salzsaure Lösung zuvor dialysirt worden ist. Wird nämlich zu der Lösung in 0,8^o/iger HCl Ammoniak zugesetzt, so bildet sich eine nicht unbeträchtliche Menge von Ammoniumchlorid; ich fand aber, dass NH₄Cl die Fällung des Histons zu hindern im Stande ist. Kochsalz, Chlorcalcium und andere Salze haben dieselbe Wirkung. Auch konnte das mittelst Ammoniak gefällte Histon durch Zusatz einer genügenden Menge von Chlorammonium völlig wieder gelöst werden.

Bang¹⁾ erwähnt, dass Ammonsalze überhaupt die Fällung der Histone mittelst Ammoniak fördern. Welcher Ursache es zuzuschreiben ist, dass ich in dieser Hinsicht ein ganz entgegengesetztes Resultat erhielt, ist mir nicht klar geworden.

Ist die salzsaure Histonlösung bis auf nahezu neutrale Reaction dialysirt worden, so kann das Histon mittelst Ammoniak gefällt werden und es löst sich im Ueberschuss desselben nicht; auch mittelst Natronlauge kann das Histon gefällt werden; dann ist es aber im Ueberschuss vollkommen löslich.

Die Identität des mit CaCl₂ im Thymusextracte erhaltenen Niederschlages mit Nucleohiston wird schliesslich von den später zu erwähnenden Elementaranalysen bewiesen, welche, insoweit als dieselben einen relativ hohen N- und P-Gehalt, dagegen einen ziemlich niedrigen C-Gehalt als Resultat lieferten, mit denjenigen Lilienfeld's übereinstimmen.

Ich bemerke hier schon, dass das neben dem Nucleohiston im Thymusextracte vorhandene Nucleoproteid von Calciumchlorid nur sehr unvollständig gefällt wird. Das zweimal mit CaCl₂ gefällte Nucleohiston kann also als vom Nucleoproteid gereinigt betrachtet werden, wie es später noch des Näheren nachgewiesen werden wird.

Es lag auf der Hand, das von Calciumchlorid gefällte Nucleohiston als eine Calciumverbindung zu betrachten, wie das unter Anderem bei dem Casein aus der Milch der Fall ist.

1) Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 468.

Dennoch schien es mir geboten, zu untersuchen, ob das mit CaCl_2 gefällte Nucleohiston thatsächlich eine Calciumverbindung war; die Möglichkeit war nicht ohne Weiteres ausgeschlossen, dass hier vielleicht eine molekulare Verbindung von Nucleohiston mit CaCl_2 vorlag, oder auch, dass gar keine Verbindung mit Calcium oder mit Calciumchlorid stattgefunden hatte, sondern dass das Nucleohiston in Chlorcalciumlösung einer gewissen, ziemlich geringen Concentration unlöslich war.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde folgender Weise verfahren:

In dem von den Formelementen getrennten Thymusauszuge wurde das Nucleohiston mittelst Essigsäure gefällt; der Niederschlag wurde sodann zur Entfernung der Phosphorsäure mit Wasser ausgewaschen und darauf in Wasser mit möglichst wenig Ammoniak gelöst. Aus dieser Lösung wurde das Nucleohiston durch Zusatz von CaCl_2 wieder gefällt; der Niederschlag wurde dann unter Alkohol gebracht. Da Alkohol etwa 12%iges CaCl_2 löst und die im Niederschlage vorhandene Flüssigkeit nur 0,1% CaCl_2 gelöst enthielt, konnte in dieser Weise das Nucleohiston vom überschüssigen CaCl_2 getrennt werden; der Niederschlag wurde mit Alkohol ausgewaschen, bis der abfiltrirte Alkohol kein Chlorcalcium mehr enthielt. Das Nucleohiston wurde dann unter Aether gebracht, abfiltrirt und getrocknet.

Die Asche der auf diese Weise bereiteten, also kein freies Kalksalz enthaltenden Substanz enthält immer Calcium in grosser Menge, woraus hervorgeht, dass das Nucleohiston entweder an Calcium oder an CaCl_2 gebunden war.

Sollte das mit CaCl_2 gefällte Nucleohiston als eine Calciumverbindung zu betrachten sein, so wäre diese Verbindung mit einem Salze zu vergleichen, wo das Calcium das Metall, das Nucleohiston den Säurerest darstellte, und dann wäre es wahrscheinlich, dass stärkere Säuren dieses Calciumsalz zu zerlegen im Stande sein würden, sodass z. B. bei der Extraction mit nicht allzuschwacher Essigsäure im Filtrate Calciumacetat zu finden und das Nucleohiston ungelöst auf dem Filter

bleiben würde. Das Filtrat würde also mit Kaliumoxalat Kalkreaction, dagegen mit Silbernitrat keine Chlorreaction geben müssen. War aber das Nucleohiston mit CaCl_2 verbunden, so würde bei der Extraction mit Essigsäure das Filtrat, wenn wenigstens Zerlegung stattfand, CaCl_2 enthalten müssen, mithin sowohl eine Kalk- als eine Chlorreaction geben; falls keine Zerlegung stattfand, würde das Filtrat keine dieser beiden Reactionen geben müssen. Es stellte sich jetzt heraus, dass bei der Extraction mit 5%iger Essigsäure das Filtrat eine starke Kalkreaction, keine Spur aber einer Chlorreaction zeigte, wodurch also nachgewiesen war, dass das mit CaCl_2 gefällte Nucleohiston an Calcium gebunden und also sehr wahrscheinlich als ein Calciumsalz zu betrachten war.

Dasselbe Resultat wurde durch Fällung des Nucleohistons mit CaCl_2 unmittelbar aus dem Thymusextracte erhalten; zur weiteren Reinigung wurde es in Wasser mit ein Paar Tropfen verdünntem Ammoniak gelöst und die Lösung zur Entfernung des möglicher Weise gebildeten Tricalciumphosphats längere Zeit centrifugirt; die Flüssigkeit wurde dann ohne Beimischung des sehr geringen Bodensatzes abgegossen und wieder mit CaCl_2 gefällt; der Niederschlag wurde mit Alkohol ausgewaschen, unter Aether gebracht und getrocknet. Bei der Extraction dieser Substanz mit 5%iger Essigsäure zeigte das Filtrat gleichfalls eine starke Kalk-, dagegen keine Chlorreaction.

Auch Kaliumoxalat ist im Stande, das Calcium-Nucleohiston zu zerlegen, wie folgender Versuch zeigt.

Im Thymusextracte wurde das Nucleohiston mit CaCl_2 gefällt; der Niederschlag wurde in Wasser mit ein Paar Tropfen verdünntem Ammoniak gelöst und die Lösung filtrirt. Darauf wurde dem Filtrate Kaliumoxalat zugesetzt, in Ueberschuss, so dass es mehr als genügte, alles Calcium als Calciumoxalat zu fällen. Das Gemisch blieb 24 Stunden stehen, damit das Calciumoxalat möglichst vollständig gefällt wurde. Sodann wurde zweimal durch einen Propfen zusammengepressten Filtrirpapiers,¹⁾ darauf nochmals durch ein sehr dichtes asche-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 234.

freies Filter filtrirt. Es waren nun im Filtrate mikroskopisch keine Calciumoxalatkrystalle mehr zu finden; das Filtrat enthielt jedoch noch eine ziemliche Menge Kaliumoxalat, denn bei dem Versetzen eines Tropfens der Lösung mit CaCl_2 wurden mikroskopisch zahlreiche Krystalle von Calciumoxalat sichtbar.

Zur Entscheidung der Frage, ob das Nucleohiston in dieser Lösung noch Calcium enthielt, wurde es mit dem zweifachen Volumen Alkohol und Aether gefällt, der Niederschlag wurde abfiltrirt und getrocknet; das Gewicht der bei 110° getrockneten Substanz betrug 0,437 g; diese Menge wurde mit ungefähr 10 ccm. 10%iger Essigsäure gekocht, wodurch das Calcium, wenn noch anwesend, als Calciumacetat in Lösung übergehen musste. Beim Kochen löste sich das Nucleohiston nicht; es wurde also abfiltrirt und dem Filtrate Kaliumoxalat zugesetzt, nachdem die saure Reaction mittelst Ammoniak abgestumpft war. Nach 24 Stunden war kein Niederschlag von Calciumoxalat entstanden; ein äusserst geringer Bodensatz hatte sich gebildet, worin aber mikroskopisch keine Calciumoxalatkrystalle zu entdecken waren. Wäre das Calcium dem Nucleohiston nicht durch das Kaliumoxalat entzogen, so hätte ein Niederschlag von ungefähr 18 mg Calciumoxalat entstehen müssen, weil nach den später anzuführenden quantitativen Bestimmungen das mit CaCl_2 gefällte Nucleohiston ungefähr $1\frac{1}{3}\%$ Calcium enthält.

Wie schon bemerkt, ist die Verbindung von Nucleohiston mit Calcium im Ueberschuss von Chlorcalcium löslich; die Lösung beginnt bei einem Gehalt von $\pm 0,6\%$ CaCl_2 ; enthält die Flüssigkeit ungefähr 2% CaCl_2 , so ist alles wieder gelöst.

Ausser Chlorcalcium vermögen auch andere Salze der Alkali- und Erdalkalimetalle bei einem bestimmten Gehalt an Salz das Nucleohiston zu fällen.

BaCl_2 fällt bei einem Gehalt von $0,1\%$ wie CaCl_2 das Nucleohiston vollkommen; der Niederschlag ist löslich im Ueberschuss von Salzen (in 5% igem BaCl_2 löst er sich ganz) und einigermassen auch in Wasser, leicht löslich in Wasser bei sehr schwach alkalischer Reaction. Bei der Behandlung mit $0,8\%$ iger HCl liefert der Niederschlag Histon.

MgSO₄ fällt das Nucleohiston bei einem Gehalt von 0,2% auch meistens vollkommen; oft aber bekommt man erst eine vollständige Fällung, wenn man das Extract einige Stunden mit dem Magnesiumsulfat stehen lässt. Das Magnesium-Nucleohiston ist etwas besser im Wasser löslich, als das Baryum- und Calcium-Nucleohiston. Bei einem Gehalt von $\pm 2\%$ MgSO₄ ist der Niederschlag wieder völlig gelöst.

Mit NaCl bekommt man immer nur eine theilweise Fällung; bleibt das Extract etwas länger mit dem Kochsalz stehen, so vermehrt sich der Niederschlag nicht: am besten wird das Nucleohiston gefällt, wenn soviel Kochsalz zugesetzt wird, dass die Flüssigkeit davon 0,9% enthält; es ist das bemerkenswerth insoweit, als das Gemisch bei diesem Gehalt isotonisch ist mit den Körperflüssigkeiten. Das Natrium-Nucleohiston bildet einen klebrigen Niederschlag, der sich sehr gut löst in Wasser, ohne dass Zusatz von Ammoniak erforderlich wäre; zumal wenn man den mit Wasser gemischten Niederschlag einige Zeit bei 37° stehen lässt, entsteht eine klare, bläuliche Lösung. Wird dieser Lösung NaCl zugesetzt, bis der Gehalt daran $\pm 0,9\%$ beträgt, so wird das Natrium-Nucleohiston wieder gefällt, während bei einem Gehalt von 2 bis 2 $\frac{1}{2}\%$ NaCl der ganze Niederschlag wieder gelöst wird. Der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt (worüber unten Näheres) stimmt mit demjenigen des Calcium-Nucleohistons überein.

Bei der Behandlung mit verdünnter Salzsäure wird auch das Natrium-Nucleohiston zerlegt in Nuclein und Histon; das hierzu benutzte Nucleohiston war aus dem Thymusextracte mit Kochsalz gefällt, sodann in Wasser gelöst und wieder mit 0,9%iger NaCl gefällt, wodurch zugleich das Nucleoproteid, welches sich, wie auch Bang fand, in 0,9%iger NaCl löst, entfernt wurde; überdies ist das Nucleoproteid in 0,8%iger HCl löslich, sodass das Nuclein, aus Natrium-Nucleohiston bereitet, kein Nucleoproteid mehr enthält. Die von diesem Nuclein gegebenen Eiweissreactionen sind also nicht einer Verunreinigung mit Nucleoproteid zuzuschreiben und man hat es hier zweifelsohne mit Nuclein, nicht mit Nucleinsäure zu thun.

Zur Fällung des mittelst 0,8%iger HCl aus Natrium-

Nucleohiston bereiteten Histons war es auch jetzt wieder nöthig, die Histonlösung zu dialysiren; erst dann bekommt man mit Ammoniak einen ausgiebigen Niederschlag. Durch die Dialyse wird die Reaction neutral, während das Histon gelöst bleibt.

Ausser der Ammoniakreaction besitzt die dialysirte Flüssigkeit auch die anderen Eigenschaften einer Histonlösung; es werden z. B. Hühnereiweiss und Fibrinogen durch dieselbe gefällt. Mittelst Salpetersäure entsteht ein Niederschlag, der sich beim Erhitzen löst.

Bei der Behandlung mit Millon's Reagens entsteht kein oder nur ein geringer rother Niederschlag; die ganze Flüssigkeit erhält aber eine ziemlich dunkelrothe Färbung. Es ist nicht nöthig, die Histonlösung mit dem Millon'schen Reagens zu kochen: die rothe Farbe entsteht, wenn auch sehr langsam (z. B. in 24 Stunden), ebenso leicht oder selbst besser bei Zimmertemperatur.

Chlorkalium und Chlorammonium verhalten sich dem Nucleohiston gegenüber wie Chlornatrium. Mit Natriumsulfat und Kaliumsulfat entsteht im Thymusextracte ein geringerer Niederschlag, als mit Chlornatrium.

Es ergibt sich also aus dem Obenstehenden, dass die Alkaliverbindungen des Nucleohistons in Wasser löslich sind und dass sie bei einem bestimmten Gehalt der Flüssigkeit an Alkalisalz wenigstens theilweise gefällt werden; die Erdalkaliverbindungen sind viel weniger löslich in Wasser und ganz unlöslich in Lösungen von 0,1 bis 0,3% der Erdalkalisalze.

Zur Fällung des Nucleohistons mittelst 0,9%iger NaCl oder anderen Alkalisalzen ist es nothwendig, das frische Material zu benutzen; wenn der aus der Drüse bereitete Extract mehr als 24 Stunden alt ist, erhält man meistens einen geringeren Niederschlag; es scheint, dass die Zusetzung von Chloroform, welche oft angewendet wird, um Fäulniss vorzubeugen, die Fällung des Nucleohistons mittelst Alkalisalzen auch einigermaßen erschwert; zur Fernhaltung von Fäulniss verfährt man also wohl am besten, wenn man die Extraction bei niedriger Temperatur sich vollziehen lässt.

Ich habe versucht, zu ermitteln, welche Concentrationen

der verschiedenen Alkalisalze eine möglichst vollständige Fällung verursachen. Es geschah dies auf folgende Weise.

Die feinzerhackte Thymusdrüse wurde mit Wasser extrahiert und im Extracte mittelst Zusetzung von Kochsalzlösung bis 0,9% das Nucleohiston gefällt. Der Niederschlag wurde abcentrifugiert und in Wasser gelöst; um möglichst wenig Kochsalz in der Lösung zu erhalten, wurden die Centrifugierröhrchen mit destillirtem Wasser rasch ausgewaschen zur Entfernung des der Röhrenwand anhaftenden 0,9%igen Kochsalzes. Wenn das Auswaschen nur kurz dauert, löst sich der Niederschlag nicht merklich. Sodann wurde der Niederschlag mit ungefähr dem zwanzigfachen Volumen destillirten Wassers gemischt, worin es sich nach einiger Zeit ganz löste; die Lösung wurde filtrirt. Das Filtrat zeigte nur eine sehr geringe Opalescenz und enthielt sicher nicht mehr als 0,05% NaCl.

Eine bestimmte Anzahl Cubikcentimeter (6 oder 12) dieser Lösung wurde nun abgemessen und in ein Reagensröhrchen gebracht. Hierauf wurde tropfenweise die Alkalisalzlösung von bekannter Stärke (meistens eine bei 15° ganz oder halb gesättigte Lösung) zugesetzt, bis sich der Niederschlag beim Zusetzen von mehr Salz nicht vermehrte.

Die ersten Tropfen verursachen einen Niederschlag, der sich beim vorsichtigen Umschütteln wieder löst; die Flüssigkeit hat eine etwas stärkere Opalescenz bekommen; bei dem Zusatz des vorletzten Tropfens wird das Röhrchen in der Regel erst undurchsichtig; wird darauf noch ein Tropfen zugesetzt, so entsteht, wenn man wenigstens NaCl, KCl, NH_4Cl oder $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ zur Fällung anwendet, ein grobflockiger, klebriger Niederschlag, welcher sich ziemlich schnell am Boden absetzt; vergrössert man nun den Salzgehalt noch mehr, so vermehrt sich der Niederschlag nicht; es ist dies eben dadurch ziemlich genau wahrnehmbar, weil der Niederschlag grobflockig ist und sich absetzt. Bei der Fällung mit Na_2SO_4 , K_2SO_4 oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ist der Niederschlag meistens nicht so gross und setzt sich nicht so schnell am Boden ab; dennoch ist auch hier mit hinreichender Genauigkeit zu beobachten, wenn die richtige Menge Salz zugesetzt ist.

Bei diesen Versuchen wurde immer derselbe Tropfapparat gebraucht; das Volumen der Tropfen war vorher genau bestimmt worden. Aus der Anzahl der zugesetzten Tropfen und der bekannten Stärke der Salzlösung konnte alsdann berechnet werden, wieviel Procent Salz das Gemisch im Reagensröhrchen enthielt. Man findet in dieser Weise die geringste Menge Salz, welche den möglichst vollständigen Niederschlag verursacht.

Für einige Salzlösungen fand ich die folgenden Concentrationen. (Der Gehalt von höchstens 0,05^o/_o iger NaCl, welcher in der Nucleohistonlösung vorhanden war, ist ausser Betracht gelassen.)

NaCl	=	0,88 ^o / _o ,
KCl	=	1,13 ^o / _o .
NH ₄ Cl	=	0,84 ^o / _o ,
C ₂ H ₃ O ₂ Na	=	1,31 ^o / _o ,
Na ₂ SO ₄	=	1,42 ^o / _o ,
K ₂ SO ₄	=	1,60 ^o / _o .

Die Concentrationen des NaCl, KCl, NH₄Cl und C₂H₃O₂Na sind ungefähr isotonisch mit den Körperflüssigkeiten; die Zahlen für Na₂SO₄ und K₂SO₄ zeigen davon jedoch nicht unerhebliche Abweichungen.¹⁾

Das freie Nucleohiston, welches gebildet wird, wenn z. B. eine Lösung von Calciumnucleohiston mit nicht allzu schwacher Essigsäure behandelt wird, ist unlöslich in Wasser; man kann den durch Essigsäure hervorgerufenen Niederschlag mit Wasser auswaschen, bis das Waschwasser vollkommen neutral reagirt; es zeigt sich alsdann, dass der Niederschlag völlig ungelöst geblieben ist. Oft zeigt das Waschwasser der letzten Auswaschungen eine sehr geringe Opalescenz; die Flüssigkeit enthält dann aber so wenig Eiweiss, dass Salpetersäure keine Trübung verursacht und die Xanthoproteinreaction, auch nach Verstärkung derselben mittelst Ammoniak, nur sehr schwach sichtbar ist. Wenn aber eine so geringe Menge Eiweiss noch eine sichtbare Opalescenz verursacht, so darf man annehmen, dass dieses Eiweiss nicht gelöst vorhanden ist, sondern so fein zertheilt vorkommt, dass es durch Centrifugiren oder

1) Auch von Ammonsulfat, Kalium- und Natriumnitrat, Kaliumoxalat und Kaliumtartrat wird das Nucleohiston gefällt und löst sich in Ueberschuss.

Filtriren nicht ganz entfernt werden kann; und sollte auch diese Meinung unrichtig sein und also eine Spur des freien Nucleohistons sich im Wasser lösen, so ist doch die betreffende Menge zu gering, um in Betracht zu kommen.

Der Auffassung nach, dass das Calciumnucleohiston ein Salz ist, muss, nachdem das Calcium mittelst Essigsäure demselben entzogen ist, das Nucleohiston als Säure zurückbleiben.

Dass nun der in der oben angegebenen Weise von Essigsäure gereinigte Niederschlag thatsächlich eine Säure darstellt, lässt sich leicht dadurch nachweisen, dass er Alkalien z. B. Ammoniak bindet. Setzt man nämlich dem in Wasser suspendirten Niederschlag ein wenig verdünntes Ammoniak zu, so bleibt die Reaction neutral, während ein Theil des Niederschlages sich löst; auch bei der weiteren Zusetzung von Ammoniak bleibt die Reaction neutral, bis sich der ganze Niederschlag gelöst hat. Offenbar hat sich das Ammoniaksalz des Nucleohistons gebildet, welches in Wasser sehr leicht löslich ist. Zur Kontrolle habe ich eine Menge des letzten Waschwassers genommen, gleich gross wie diejenige Menge Wasser, worin der Niederschlag suspendirt war, und demselben ebenso viel Ammoniak zugesetzt, als nöthig war, um den ganzen Niederschlag zu lösen; es zeigte sich nunmehr, dass diese Flüssigkeit mit Lackmuspapier oder mit Phenolphthalein stark alkalisch reagirte.

Da also das freie Nucleohiston in Wasser unlöslich, seine Verbindungen mit Erdalkalien darin wenig löslich sind, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass das Nucleohiston im wässerigen Thymusauszuge als Alkalisalz vorhanden ist, welche Verbindung in Wasser leicht löslich ist.

Bei der Fällung des Nucleohistons aus dem Thymusauszuge mit Calciumchlorid wird, wie gezeigt wurde, das Calciumsalz gebildet. Das Calcium vermag also das Alkalimetall aus seiner Verbindung mit Nucleohiston zu verdrängen. Man muss sich demnach vorstellen, dass z. B. aus Nucleohistonnatrium $+ \text{CaCl}_2$ gebildet wird Nucleohistoncalcium $+ 2 \text{NaCl}$; das Nucleohistoncalcium fällt alsdann aus, nicht nur weil es an und für sich schon weniger löslich ist als die

Natriumverbindung, sondern vor Allem auch weil es in der betreffenden Chlorcalciumlösung unlöslich ist.

Ebenso wie CaCl_2 vermögen wahrscheinlich auch Baryum- und Magnesiumsalze, obwohl dies nicht unmittelbar nachgewiesen wurde, die Alkalimetalle aus ihren Verbindungen mit Nucleohiston zu verdrängen.

Die Löslichkeit der Salze des Nucleohistons kann also folgender Weise tabellarisch zusammengestellt werden.

Alkalisalze	{	löslich in Wasser, mehr weniger unlöslich in sehr verdünnten Alkali- salzlösungen (für $\text{NaCl} \pm 0,9\%$), löslich im Ueberschuss von Salzen.
Magnesiumsalz	{	ziemlich löslich in Wasser, unlöslich in 0,1 bis 0,3%iger MgSO_4 , löslich in Ueberschuss von Salzen.
Calciumsalz	{	wenig löslich in Wasser, unlöslich in 0,1 bis 0,5%iger CaCl_2 , löslich in Ueberschuss von Salzen.
Baryumsalz	{	wenig löslich in Wasser, unlöslich in 0,1 bis 1,8%iger BaCl_2 , löslich in Ueberschuss von Salzen.
Schwere Metallsalze	{	unlöslich in Wasser, unlöslich in Salzlösungen.

Weil das Histon einen basischen Körper darstellt, ist es wahrscheinlich, dass die sauren Eigenschaften des Nucleohistons dem Nuclein zukommen.

Lilienfeld betrachtete das Nucleohiston als ein saures Salz, worin das Histon die Stelle des Metalls der gewöhnlichen Salze vertrat. Mit dieser Auffassung stimmt überein, dass das Nuclein sich mit Metallen zu verbinden vermag. Zur näheren Untersuchung dieser Verbindungen bereitet man das Nuclein auf gewöhnliche Weise mittelst Fällung des Nucleohistons mit Essigsäure und Digestion des Niederschlages während 12 bis 18 Stunden mit 0,8%iger HCl ; das ungelöst gebliebene Nuclein wird sodann mit Wasser ausgewaschen und darauf in Wasser mit Hülfe von ein wenig Alkali gelöst; es braucht hierbei die Reaction nicht alkalisch zu werden; aus dieser Lösung kann das Nuclein mittelst Zusatz von nicht allzu geringen Mengen Alkali- oder Erdalkalisalzen gefällt werden. Der Niederschlag löst sich im Ueberschuss dieser Salze nicht.

Das mittelst Calcium-, Baryum- oder Magnesiumsalze gefällte Nuclein ist löslich in Alkalien, unlöslich in Wasser; durch Auswaschen mit Wasser kann also z. B. das mit CaCl_2 gefällte Nuclein von überschüssigem CaCl_2 gereinigt werden. In der Asche des in dieser Weise von CaCl_2 gereinigten Nucleins findet man immer eine grosse Menge Calcium, woraus hervorgeht, dass das mit CaCl_2 gefällte Nuclein eine Calciumverbindung darstellt.

Nach einer anderen Methode, durch Spaltung nämlich des Nucleohistons mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ oder $\text{Ca}(\text{OH})_2$, erhielt Lilienfeld die Baryum- resp. Calciumverbindung des Nucleins. An dieser Stelle muss ich noch nebenbei bemerken, dass schon Lilienfeld (l. c. Bd. XVIII, S. 484) die Fällung der Barytverbindung des Nucleohistons mittelst BaCl_2 erwähnt, ohne dass er aber diesen Befund des Näheren begründet.

Wird das mit 0,8%iger HCl bereitete Nuclein mittelst Natronlauge gelöst, so entsteht das Natriumsalz; setzt man dieser Lösung Natriumchlorid in nicht allzu geringer Menge zu, so fällt das Nucleinnatrium; durch Auswaschen mit Wasser kann der Niederschlag allmählich wieder gelöst werden. Es geht hieraus also hervor, dass die Verbindung des Nucleins mit Natrium löslich ist in Wasser, unlöslich aber in Salzlösungen; der einzige Unterschied gegen Nucleohistonnatrium ist, dass die letztere Verbindung sich im Ueberschuss von Salzen löst. Dasselbe gilt in Betreff der Kalium- und Ammoniumverbindungen.

Wenn man das mittelst 0,8%iger HCl bereitete Nuclein in Wasser mit ein wenig Alkali löst und in dieser Lösung mittelst CaCl_2 einen Niederschlag hervorrufft, bekommt man, wie gezeigt wurde, die Calciumverbindung des Nucleins. Auch hier vermag also, wie beim Nucleohiston, das Calcium die Alkalimetalle aus ihren Verbindungen mit dem Nuclein zu verdrängen.

Säuren, z. B. 0,8%ige HCl , zerlegen die Verbindung des Nucleins mit Calcium, sodass nach genügender Auswaschung mit 0,8%iger HCl in der Asche des Nucleins kein Calcium mehr vorhanden ist.

Bang hat aus dem Thymusauszuge eine Substanz bereitet, welche bei einem Gehalt von etwa 0,9% an Kochsalz

gefällt wurde, von 2⁰/₀iger NaCl jedoch wieder gelöst wurde, in dieser Hinsicht also völlig übereinstimmt mit dem mittelst 0,9⁰/₀iger NaCl gefällten Nucleohiston.

Die Methode, welcher Bang sich zur Darstellung dieser von ihm als Nucleinsäure betrachteten Substanz bediente, war kurz folgende:

Nach Entfernung des Nucleoproteids mittelst Extraction mit 0,9⁰/₀iger NaCl wurde die Thymusdrüse mit Wasser ausgezogen und der Auszug mit Kochsalz gesättigt. Der dadurch gebildete Niederschlag wurde abfiltrirt und das Filtrat dialysirt; es wurde durch die Dialyse die Nucleinsäure gefällt. Man kann, zur Darstellung der Nucleinsäure, nach Bang auch unmittelbar im wässerigen Thymusauszuge mittelst Zusatz von Kochsalz bis zu einem Gehalt von 0,9⁰/₀ einen Niederschlag hervorrufen; man filtrirt ab, löst den Niederschlag in Wasser und sättigt die Lösung mit Kochsalz. Man bekommt jetzt wieder eine Fällung, welche abfiltrirt wird; im Filtrate fällt dann durch Alkohol die Nucleinsäure.

Nach dieser letzten Methode fällt Bang also den Thymusauszug unmittelbar mit 0,9⁰/₀iger NaCl. Es besteht der so erhaltene Niederschlag ohne Zweifel aus Nucleohiston. Im Vorhergehenden ist gezeigt, dass man aus dem mit 0,9⁰/₀iger NaCl verursachten Niederschlage Histon und Nuclein bekommen kann, und ist darauf hingewiesen worden, dass der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt übereinstimmt mit dem auf andere Weise erhaltenen Nucleohiston. Dieses Nucleohiston löst Bang in Wasser und sättigt die Lösung mit Kochsalz; filtrirt man den dadurch entstandenen Niederschlag ab, so kann nach Bang im Filtrate mittelst Alkohol die Nucleinsäure gefällt werden. Vom Nucleohiston ist also durch die Sättigung mit Kochsalz entweder Nucleinsäure abgespalten, auf welche Möglichkeit bereits von Kossel aufmerksam gemacht worden ist, oder auch der mittelst Alkohol hervorgerufene Niederschlag war keine Nucleinsäure.

Dass Bang aus dieser Substanz mittelst Extraction mit Salzsäure kein Histon erhalten konnte, ist kein Beweis dafür, dass kein Histon darin vorhanden war, weil die Histonlösung

von Bang nicht dialysirt wurde (es erhellt wenigstens aus seiner Beschreibung nichts davon); zur Fällung des Histon mit Ammoniak ist aber die vorherige Dialyse nothwendig.

Mittelst Salzsäure konnte Bang, wie er erwähnt, im Allgemeinen nur wenig Histon aus dem Thymusextracte bekommen: ich glaube das dem zuschreiben zu müssen, dass die Histonlösungen nicht dialysirt worden waren.

Es ist fernerhin bemerkenswerth, dass die Substanz, welche Bang als Nucleinsäure betrachtet, von 0,9%iger NaCl gefällt wird und sich dann in 2%iger NaCl wieder löst, weil auch dem Nucleohiston diese Eigenschaft zukommt.

Man möchte also dazu neigen, die Nucleinsäure Bang's für Nucleohiston zu halten, wenn dieser selbst nicht ausdrücklich erwähnte, dass die Substanz mehr als 8% Phosphor enthielt, keine Biuretreaction gab und aus ihrer Lösung von Essigsäure nicht gefällt wurde.

Da ich nicht in der Lage war, mich mit den Ausführungen Bang's näher zu beschäftigen, so glaube ich vorläufig annehmen zu müssen, dass durch die Sättigung mit Kochsalz Nucleinsäure vom Nucleohiston abgespalten wird.

Der wichtigste Schluss, zu welchem Bang kam, ist wohl dieser, dass im Thymusextracte kein Nucleohiston vorhanden sei, sondern dass er nur ein Gemisch von Nucleinsäure und Histon darstelle.

Dass mittelst Essigsäure im Thymusauszuge sowohl das Histon, als auch die Nucleinsäure gefällt wird, erklärt Bang dadurch, dass Eiweisskörper, welche mit Nucleinsäure zusammen in Lösung vorkommen, durch Essigsäure gefällt werden, wobei die Nucleinsäure mitgefällt wird. Die gewöhnliche Auffassung dieser Fällung ist indessen diese, dass die Nucleinsäure sich mit dem Eiweiss zu Nuclein oder Nucleoproteid verbunden hat, welche Verbindungen von Essigsäure gefällt werden. Wenn diese Erklärung die richtige ist, so muss man auch annehmen, dass im Thymusextracte die Nucleinsäure sich mit dem Histon verbunden hat, und dass diese Verbindung von der Essigsäure gefällt wird.

Nun gibt es aber noch andere Methoden zur Fällung

des Nucleohistons, z. B. mittelst Calciumchlorid; wäre die Auffassung Bang's die richtige, so wäre dafür keine Erklärung zu finden; man könnte sich noch vorstellen, dass die Nucleinsäure von Chlorcalcium als Calciumverbindung gefällt würde: das Histon wird jedoch, wie sich nachweisen lässt, von 0,1%igem CaCl_2 nicht gefällt. Die Nucleinsäure hindert nach Bang die Fällung der Eiweisskörper mittelst Histon, und der Anwesenheit von Nucleinsäure im Thymusextracte ist es seines Erachtens zuzuschreiben, dass das Histon aus letzterem kein Eiweiss fällen kann. Man kann sich aber auf folgende Weise von der Unwahrscheinlichkeit dieser Meinung überzeugen. Eine gewisse Menge Histon wird gelöst in 0,2%iger HCl ; die Lösung wird dialysirt, bis die Reaction neutral geworden ist. (Sicherheitshalber habe ich die Histonlösung noch ± 18 Stunden dialysirt, nachdem mit Lackmuspapier keine saure Reaction mehr nachgewiesen werden konnte.) Das Histon bleibt bei der Dialyse gelöst. Setzt man dem Thymusextracte ein wenig von dieser neutralen Lösung zu, so entsteht sofort ein Niederschlag. Aus welchem Eiweisskörper dieser Niederschlag besteht, habe ich nicht näher untersucht; wohl aber fand ich, dass eine neutrale Lösung von HCl -Histon im Stande war, in einer Lösung von Natriumnucleohiston oder auch in einer Lösung des im Thymusextracte vorhandenen Nucleoproteids einen Niederschlag hervorzurufen.

Die übrigen im Thymusextracte vorhandenen Eiweisskörper.

Das von Lilienfeld entdeckte Nucleoproteid wird von Chlorcalcium nur zum kleinsten Theile gefällt. Wenn die Thymusdrüse 12—24 Stunden mit Wasser extrahirt worden ist, kann das Nucleohiston mittelst 0,1%igem CaCl_2 völlig gefällt werden. Im Filtrate ist dann der grösste Theil des Nucleoproteids gelöst vorhanden und kann daraus mit Essigsäure oder Salzsäure gefällt werden. Nucleohiston ist aber im Filtrate nicht mehr vorhanden, weil die salzsaure oder essigsaure Fällung sich im Ueberschuss dieser Säuren völlig löst: weiter lässt sich von der mit Essigsäure gefällten Substanz

mittelst 0,8^o/_oiger HCl kein Histon abspalten; löst man diese Substanz in 0,2^o/_oiger HCl, so entsteht bei der Pepsindigestion ein Niederschlag von Nuclein. Der Phosphorgehalt dieses Nucleoproteids beträgt ungefähr 1^o/_o; von den Purinbasen konnte ich, ebenso wie beim Nucleohiston, namentlich Adenin daraus erhalten.

Wenn das Nucleohiston mittelst CaCl_2 gefällt ist, löst sich das im Filtrate befindliche Nucleoproteid oft nur schwierig im Ueberschuss von Essigsäure; dagegen ist es schon in 0,1—0,2^o/_oiger HCl vollkommen löslich. Das mit Essigsäure gefällte Nucleoproteid kann in Wasser, unter Zusatz von ein wenig Ammoniak ungefähr bis zur neutralen Reaction, gelöst werden; fällt man nun nochmals mit Essigsäure, so löst sich der Niederschlag viel leichter in Ueberschuss der Säure.

Gebraucht man zur Lösung des mit Essigsäure gefällten Nucleoproteids nicht allzu viel Wasser, so kann mittelst CaCl_2 wieder ein Theil des Nucleoproteids gefällt werden; beim Nucleohiston genügte ein Gehalt von 0,1^o/_o Chlorcalcium zur völligen Präcipitation; das Nucleoproteid wird etwas leichter gefällt, wenn man etwas mehr CaCl_2 , z. B. bis 0,2^o/_o, zusetzt; der Niederschlag ist dann meistens etwas grösser, immerhin aber sehr unvollständig.

Die Löslichkeitsverhältnisse des mittelst CaCl_2 gefällten Nucleoproteids stimmen ungefähr mit denjenigen des Calciumnucleohistons überein; der Niederschlag löst sich im Ueberschuss von CaCl_2 und anderen Salzen und auch in Wasser unter Zusatz von ein Paar Tropfen verdünnten Ammoniaks. Wenn es bei dieser sehr leicht alkalischen Reaction gelöst ist, so entsteht bei abermaligem Zusatz von CaCl_2 nicht von Neuem ein Niederschlag, sondern höchstens eine Opalescenz. Es ergibt sich also, dass das Nucleoproteid bei neutraler Reaction nur zum kleinsten Theile, bei schwach alkalischer Reaction so gut wie gar nicht mehr von Chlorcalcium gefällt wird.

Wenn das Nucleohiston durch zweimalige Fällung aus dem Thymusauszuge bereitet wird, ereignet sich mit dem Nucleoproteid also Folgendes:

Bei der ersten Präcipitation wird ein kleiner Theil gefällt, während der grösste Theil gelöst bleibt, erstens weil CaCl_2 das Nucleoproteid immer sehr unvollständig fällt und zweitens weil 0,1% CaCl_2 nicht derjenige Gehalt ist, wobei in einer Lösung des Nucleoproteids der möglichst grosse Niederschlag entsteht; wie gesagt, bekommt man mittelst 0,2%igem CaCl_2 meistens einen etwas reichlicheren Niederschlag.

Löst man den mit CaCl_2 hervorgerufenen Niederschlag, welcher also zum allergrössten Theil aus Nucleohiston besteht, in Wasser unter Zusatz von ein wenig verdünntem Ammoniak und fällt nochmals mit CaCl_2 , so bleibt bei dieser geringen alkalischen Reaction auch der Rest des Nucleoproteids gelöst; im Filtrate findet man dann auch immer ein wenig Nucleoproteid, welches mit Essigsäure oder Salzsäure gefällt werden kann und sich im Ueberschuss dieser Säuren löst.

Mittelst zweimaliger Präcipitation mit 0,1%igem CaCl_2 kann also das Nucleohiston vom Nucleoproteid getrennt werden.

Ein brauchbares Mittel zur Entscheidung der Frage, ob das Nucleohiston vom Nucleoproteid gereinigt ist, bildet die Millon'sche Reaction. Das Nucleoproteid gibt nämlich diese Reaction stark, das Nucleohiston dagegen viel schwächer. Der Thymusauszug oder der darin mittelst Essigsäure verursachte Niederschlag geben auch eine starke Reaction. Wird einmal mit CaCl_2 gefällt, so gibt der Niederschlag schon eine viel schwächere Reaction, während diese nach zweimaliger Fällung mit CaCl_2 noch etwas vermindert ist. Immer aber gibt das Nucleohiston auch nach dreimaliger Fällung mit CaCl_2 oder auch mit 0,9%iger NaCl noch eine schwache Millon'sche Reaction. Diese letztere scheint also dem Nucleohiston selbst zuzukommen. Weil übrigens das Histon die Millon'sche Reaction gibt, so war dies für das Nucleohiston schon von vornherein wahrscheinlich. Auch die Xanthoproteinreaction ist beim Nucleoproteid stärker, als beim Nucleohiston. Das Nucleoproteid unterscheidet sich fernerhin vom Nucleohiston durch die Adamkiewicz'sche Reaction; es wird diese vom Nucleoproteid gegeben, vom Nucleohiston nicht. Setzt man aber zuvor dem Nucleohiston α -Naphthol

zu, so kommt die Adamkiewicz'sche Reaction wohl zu Stande. Gebraucht man an Stelle des α -Naphthol Thymol, so entsteht eine karminrothe Farbe. Das Nucleohiston gibt also die Reaction von Molisch, allein es enthält zu wenig aromatische Gruppen für das richtige Zustandekommen der Adamkiewicz'schen Reaction; hiermit stimmt überein, dass die Reaction von Millon nur schwach ist beim Nucleohiston, stark beim Nucleoproteid.

Die Asche des mit CaCl_2 gefällten und durch Auswaschen mit Alkohol von überschüssigem CaCl_2 gereinigten Nucleoproteids enthält immer eine grosse Menge Calcium, woraus sich ableiten lässt, dass man es hier, sowie beim Nucleohiston, mit einer Calciumverbindung zu thun hat.

Baryumchlorid fällt das Nucleoproteid ebenso wie Calciumchlorid; auch Magnesiumsulfat kann eine Fällung verursachen. Die Alkalisalze bewirken aber in einer Lösung des Nucleoproteids gar keine Fällung; auf dieser letzten Eigenschaft beruht die Trennung des Nucleohistons vom Nucleoproteid, welche von Bang angegeben wurde.

Nach dieser Methode wird die Thymusdrüse vor der Extraction mit Wasser, mit 0,9%iger NaCl ausgezogen, worin sich das Nucleoproteid, obwohl mit Opalescenz, löst, während das Nucleohiston ungelöst bleibt.

Man kann aus dem Nucleoproteid, wie auch Bang bemerkt, mittelst 0,8%iger HCl kein Histon bekommen; das Nucleoproteid löst sich in der Salzsäure, und beim Stehenbleiben dieser Lösung setzt sich kein Niederschlag von Nuclein ab; durch Verringerung der sauren Reaction mittelst Alkali kann das Nucleoproteid wieder gefällt werden, während der Niederschlag sich in verdünntem Ammoniak löst. Der Niederschlag entsteht schon bei der schwach sauren Reaction, wobei das Nucleoproteid gefällt wird, und enthält also kein Histon.

Wird die Lösung des Nucleoproteids in 0,8% oder 0,2%iger HCl dialysirt, so fällt bei schwach saurer Reaction das Nucleoproteid aus und löst sich nicht, wenn im Verlaufe der Dialyse die Reaction neutral wird. Der Niederschlag löst sich in verdünntem Ammoniak; im Filtrate des Niederschlags befindet sich

ebenfalls kein durch Ammoniak fällbarer Körper. Auch in dieser Weise ist also aus dem Nucleoproteid kein Histon zu erhalten.

Wenn das Nucleoproteid während einiger Zeit in ziemlich starker Säure, z. B. in 5 bis 10⁰/oiger Essigsäure oder 1 bis 2⁰/oiger Salzsäure gelöst aufbewahrt worden ist und darauf mittelst Zusetzung von Ammoniak wieder gefällt wird, so ereignet es sich oftmals, dass sich der Niederschlag sogar in Ueberschuss von Ammoniak nicht löst; man möchte meinen, es in diesem Falle mit Histon zu thun zu haben; dennoch ist diese Meinung, wie ich glaube, nicht richtig; erstens ist der Niederschlag auch so gut wie unlöslich in Säuren, weiter entsteht der Niederschlag bei der schwach sauren Reaction, wobei auch das Nucleoproteid gefällt wird, und drittens löst sich die Fällung in Kalilauge weit schwieriger als Histon. Es ergibt sich also, dass das Nucleoproteid von der Säure, worin es gelöst war, derartig verändert wird, dass es nach der Fällung mittelst Verringerung der sauren Reaction nahezu unlöslich geworden ist.

Obwohl also vom Nucleoproteid mittelst 0,8⁰/oiger oder gar stärkerer Salzsäure kein durch Ammoniak fällbares Histon abgespalten werden kann, und überhaupt die Salzsäure keine Spaltung zu bewirken scheint, so ist damit nicht gesagt, dass das Nucleoproteid keinen basischen, dem Histon vergleichbaren Körper enthält. Die Möglichkeit besteht z. B., dass aus dem Nucleoproteid das von Fleroff¹⁾ entdeckte Parahiston mittelst 2⁰/oiger Schwefelsäure bereitet werden kann. Ich habe dies aber nicht näher untersuchen können.

Durch Sättigung mit Magnesiumsulfat wird das Nucleoproteid gefällt.

Wie bereits erwähnt wurde, hat Malengreau die fractionirte Fällung mit Ammonsulfat verwendet zur Trennung des Nucleoproteids vom Nucleohiston.

Die Resultate Malengreau's weichen in dreierlei Hinsicht erheblich von den meinigen ab.

Bei der Trennung des Nucleohistons vom Nucleoproteid

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 307.

mittelst CaCl_2 bekommt man eine Menge Nucleoprotein, welche viel geringer ist als diejenige des Nucleohistons (3,5 bis 4 Theile Nucleohiston auf ein Theil des Nucleoproteids); dagegen sind diese Mengen nach der Methode von Malengreau, wenigstens schätzungsweise genommen, gleich gross. Zweitens erhielt Malengreau aus dem Nucleoprotein ein Histon.

Es ist möglich, dass diese beiden Resultate miteinander in Zusammenhang stehen. Malengreau sagt, dass es nicht leicht sei, das Nucleoprotein völlig von Nucleohiston gereinigt zu erhalten; wenn aber bei der Fällung des Nucleoproteids mittelst nahezu halber Sättigung mit Ammonsulfat schon eine Menge von Nucleohiston mitgefällt wird, so wird nicht nur die Menge des Niederschlags grösser sein, als wenn nur das Nucleoprotein gefällt war, sondern es wird auch mittelst 1%iger HCl aus dem Niederschlage Histon zu erhalten sein; das Auswaschen des Niederschlages mit Ammonsulfatlösung, welche Malengreau zur weiteren Reinigung anwendet, wird das gefällte Nucleohiston gewiss nicht wieder lösen.

Von dem aus dem Nucleoprotein erhaltenen Histon gibt Malengreau keine genaue Beschreibung; es wurde bereitete mittelst Extraction des Nucleoproteids mit 1%iger HCl ; nach 24 Stunden hatte sich eine grosse Menge des Histons gelöst, und es wurde dies sodann aus seiner Lösung mittelst Ammonsulfat gefällt. Da nun das Nucleoprotein in 1%iger HCl löslich ist (obwohl es, wie wir sehen werden, durch die Behandlung mit Ammonsulfat an Löslichkeit beträchtlich verliert), so wäre es möglich, dass die in der Salzsäure gelöste Substanz wenigstens theilweise aus Nucleoprotein bestand; hiermit stimmt überein, dass das Histon aus dem Nucleoprotein bei derselben Concentration von Ammonsulfat gefällt wurde, als das Nucleoprotein selbst.

Drittens fand Malengreau den Phosphorgehalt des Nucleoproteids zu etwa 0,5%, während das mittelst CaCl_2 von dem Nucleohiston getrennte Nucleoprotein ungefähr 1% Phosphor enthält. Welcher Ursache dieser Unterschied zugeschrieben werden muss, ist schwer zu sagen; nur will ich auf Folgendes aufmerksam machen.

Wenn man nach der Methode von Malengreau das Nucleoproteid mit Ammonsulfat fällt,¹⁾ so löst sich der Niederschlag ziemlich schwer in Wasser; die Lösung ist opalisirend. Fällt man nun nochmals mit Ammonsulfat, so ist der Niederschlag nahezu unlöslich in Wasser und auch in Säuren nur wenig löslich. Dasselbe ereignet sich, falls einmal mit Ammonsulfat gefällt und sodann mit Ammonsulfatlösung ausgewaschen wird. Durch die Behandlung mit Ammonsulfat wird also das Nucleoproteid derartig geändert, dass es seine Löslichkeit grösstentheils eingebüsst hat, und es muss demnach das Auswaschen, welches sonst meistens als ein indifferentes Vorgang betrachtet wird, in diesem Falle als nicht ganz indifferent bezeichnet werden. Es ist nun nicht unmöglich, dass bei dieser Aenderung auch der Phosphorgehalt sich geändert hat. Aus den Ausführungen Bang's muss, wie bemerkt wurde, als wahrscheinlich abgeleitet werden, dass durch Sättigung mit Kochsalz vom Nucleohiston Nucleinsäure abgespalten wird: vielleicht findet ein ähnlicher Vorgang statt, wenn das Nucleoproteid mit Ammonsulfat gefällt wird.

Ich muss an dieser Stelle bemerken, dass auch von Lilienfeld²⁾ der Phosphorgehalt des Nucleoproteids ganz niedrig gefunden wurde (0,433%). Auch hier war allerdings das Nucleoproteid in einer ziemlich starken Kochsalzlösung (etwa 10%iger NaCl) gelöst gewesen. Zugleich wird von Lilienfeld angegeben, dass die von ihm erhaltene Substanz unlöslich in Wasser ist, während das von mir erhaltene Nucleoproteid sich im Wasser löst (gemeint werden hier die Alkalisalze des Nucleoproteids). Wie das Ammonsulfat, so scheint also auch das Kochsalz in stärkeren Lösungen sich dem Nucleoproteid gegenüber nicht ganz indifferent zu verhalten.

Lilienfeld vermuthete, dass das Nucleohiston im Kerne der Thymuszellen enthalten war, das Nucleoproteid im Cytoplasma. Der Kern nimmt in diesen Zellen den grössten Raum ein; es ist also nicht unwahrscheinlich, dass im Kerne das

1) Ich habe hierzu soviel Ammonsulfat zugesetzt, dass die Flüssigkeit zu etwa einem Drittel mit Ammonsulfat gesättigt war.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 475.

Nucleohiston enthalten ist, welches auch die Hauptmasse der Eiweisskörper im Thymusauszuge darstellt.

Nachdem von Calciumchlorid besonders das Nucleohiston gefällt wird, habe ich versucht, ob vielleicht mikroskopisch Aenderungen der Thymuszellen zu beobachten waren, wenn unter dem Deckglase 0,1%iges CaCl_2 zugesetzt wurde; es war dies der Fall; der Kern wird nämlich scharf sichtbar und bekommt ein körniges Aussehen. Wird dagegen Wasser zugesetzt, oder auch eine stärkere Salzlösung, so lösen sich die Kerne ganz auf.

Diese Wahrnehmung stimmt also mit der Vermuthung Lilienfeld's überein.

Wird die fein zerhackte Thymusdrüse während kurzer Zeit, z. B. 1 bis 2 Minuten, mit Wasser geschüttelt und darauf sofort die Flüssigkeit abfiltrirt, so findet man im Filtrate nur Nucleoproteid; es weist dies darauf hin, dass das Nucleoproteid in den äussersten Schichten der Thymuszellen, somit im Cytoplasma, vorhanden ist.

Bang meint, dass das Nucleoproteid nicht in den Thymuszellen selbst, sondern in der Intercellularflüssigkeit enthalten sei; wegen der relativ grossen Mengen von Nucleoproteid, welche im Thymusauszuge vorhanden sind, halte ich diese Meinung, wenigstens in Bezug auf die lebendigen Thymuszellen, für unwahrscheinlich.

Wenn aus dem Thymusauszuge das Nucleohiston und das Nucleoproteid entfernt sind, so bleibt in der restirenden Flüssigkeit noch Eiweiss zurück. Um dieses Eiweiss zu erhalten, fällt man das Nucleohiston mit CaCl_2 und aus dem Filtrate das Nucleoproteid mit Essigsäure; das Filtrat dieses Niederschlags wird sodann neutralisirt mit Ammoniak. (Setzt man zu viel Ammoniak zu, so entsteht ein Niederschlag von Tricalciumphosphat.)

Wird das neutralisirte Filtrat mit Magnesiumsulfat gesättigt, so bekommt man einen geringen Niederschlag, welcher vielleicht ein Globulin darstellt, vielleicht auch nichts anderes ist, als ein Theil des Nucleoproteids, falls die Fällung mit Essigsäure nicht ganz vollständig gewesen war. Wenn der mittelst

Sättigung mit $MgSO_4$ erhaltene Niederschlag in Wasser gelöst wird und darauf dialysirt, so entsteht in der dialysirten Lösung mittelst Essigsäure oder Salzsäure ein Niederschlag, der sich im Ueberschuss der Säure löst.

Durch die Sättigung mit $MgSO_4$ wird nicht alles Eiweiss aus der Flüssigkeit entfernt; ein ziemlich grosser Theil bleibt gelöst und stellt wahrscheinlich ein Albumin dar. Dieses Albumin und das möglicher Weise vorhandene Globulin entstammen wohl grösstentheils der Intercellularflüssigkeit. Bang erwähnt gleichfalls das Vorhandensein eines Albumins und eines Globulins im Thymusauszuge.

In Bezug auf die relativen Mengen der im Thymusauszuge befindlichen Eiweisskörper habe ich folgende Zahlen erhalten:

160 g Thymusdrüse wurden zweimal mit \pm 500 ccm. Wasser extrahirt; dem darauf noch restirenden Thymusgewebe wurde mittelst theilweisen Auspressens der Flüssigkeit die ungefähre Consistenz der feinzerhackten Drüse gegeben; das Gewicht dieses restirenden Antheils betrug 42 g; durch die Extraction hat also das Gewicht um ungefähr 118 g abgenommen.

Aus den beiden Extracten wurden nun erhalten:

Calciumnucleohiston:	9,807 g = 69,4%
Nucleoproteid:	2,644 > = 18,7%
Sonstige Eiweisskörper:	1,685 > = 11,9%.

(Es wurden diese letzteren mittelst Coagulation bei schwach saurerer Reaction, allerdings nicht ganz vollständig, abgeschieden.)

Man findet also im Ganzen 14,136 g Eiweisskörper in 118 g der Drüse; es enthält demnach die Thymus ungefähr 12% in Wasser lösliche Eiweisskörper.

Die elementare Zusammensetzung des Nucleohistons und des Nucleoproteids aus den Thymuszellen.

Da die Analysen Lilienfeld's sich bezogen auf den Niederschlag, welcher mittelst Essigsäure im Thymusauszuge hervorgerufen werden kann, während dieser Niederschlag sowohl das Nucleohiston, als auch das Nucleoproteid enthält,

so war zu erwarten, dass die Zahlen, welche für die Zusammensetzung des reinen Nucleohistons gefunden werden sollten, von denjenigen Lilienfeld's abweichen würden. Es war dies thatsächlich der Fall.

Erstens theile ich hier die in Bezug auf das Nucleohiston erhaltenen Resultate mit.

Die Nucleohistonpräparate, welche einer Analyse unterzogen wurden, waren folgender Weise bereitet:

A. Calciumnucleohiston.

Aus dem Thymusauszuge gefällt mittelst 0,1%igen CaCl_2 ; der Niederschlag wurde gelöst in Wasser unter Zusatz von einigen Tropfen verdünnten Ammoniaks; sodann wurde filtrirt und wieder gefällt mit 0,1%igem CaCl_2 ; der Niederschlag wurde darauf dreimal mit Alkohol, sodann mit Aether ausgewaschen und schliesslich bei 110° getrocknet.

B. Magnesiumnucleohiston.

Aus dem Thymusauszuge gefällt mit 0,2%iger MgSO_4 . Der Niederschlag wurde gelöst in Wasser unter Zusatz von einer Spur Ammoniak; die Lösung wurde filtrirt und wieder gefällt mit 0,2%iger MgSO_4 . Der Niederschlag wurde dreimal mit Alkohol, darauf mit Aether ausgewaschen und bei 110° getrocknet.

C. Natriumnucleohiston.

Aus dem Thymusauszuge gefällt mittelst Zusatz von Kochsalzlösung bis 0,9%. Der Niederschlag wurde gelöst in Wasser und noch zweimal in derselben Weise mit Kochsalz gefällt. Sodann wurde dreimal mit Alkohol, darauf mit Aether ausgewaschen und der Niederschlag schliesslich bei 110° getrocknet.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen.

a) Calciumnucleohiston, Präparat I.

1. 0,4382 g trockene Substanz lieferten:

$$0,7270 \text{ g CO}_2 = 45,25\% \text{ C.}$$

$$0,2530 \text{ g H}_2\text{O} = 6,41\% \text{ H.}$$

1,0345 g trockene Substanz lieferten 0,0725 g Asche; der Aschengehalt dieses Präparates war also 7,008%. Auf die aschenfreie Substanz

berechnet, findet man also für den Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt: 48,66% C und 6,90% H.

2. 0,3447 g trockene Substanz lieferte:

0,5735 g CO₂ = 45,37% C.

0,2042 g H₂O = 6,59% H.

Auf die aschenfreie Substanz berechnet, findet man: 48,80% C und 7,08% H.

b) Natriumnucleohiston.

0,3744 g trockene Substanz lieferten:

0,6099 g CO₂ = 44,42% C.

0,2180 g H₂O = 6,46% H.

0,4015 g trockene Substanz lieferte 0,0369 g Asche; der Aschengehalt war also 9,191%.

Auf die aschenfreie Substanz berechnet, findet man demnach: 48,92% C und 7,12% H.

Der ziemlich hohe Aschengehalt des Calciumnucleohistons muss dadurch erklärt werden, dass das Calcium in der Asche als Calciumsulfat, Calciumphosphat, theilweise vielleicht auch als Calciumcarbonat vorhanden ist. Ueberdies war der Aschengehalt des Nucleohistons, nachdem mittelst Extraction mit Essigsäure das Calcium daran entzogen war, noch 1,719%.

Es war aber wichtig, zu erfahren, ob das für die obenstehenden Analysen gebrauchte Calciumnucleohiston überdies noch freie Aschenbestandtheile, z. B. CaCl₂, NaCl oder Tricalciumphosphat enthielt. Verunreinigung mit NaCl oder CaCl₂ konnte wegen der Bereitungsmethode und des Auswaschens mit Alkohol als ausgeschlossen gelten. Wurde das Präparat mit Alkohol extrahirt, der Alkohol abfiltrirt und bis zur Trockne abgedampft, so konnte nach dem Ausspülen des Abdampfschälchens mit Wasser in diesem Wasser mittelst Kaliumoxalat auch nach 24 Stunden kein Calcium nachgewiesen werden. Der Thymusauszug enthält nach Lilienfeld saure Phosphate; weil der Auszug einigermaßen amphoter reagirt, darf man annehmen, dass darin auch neutrale und basische Phosphate vorhanden sind; bei der ersten Präcipitation mittelst CaCl₂ können letztere gefällt werden; der allergrösste Theil der Phosphate wird aber in dieser Weise entfernt. Wird nun der Niederschlag von Calciumnucleohiston.

der immer einige Flüssigkeit (also auch gelöste Phosphate) und CaCl_2 enthält, gelöst in Wasser bei sehr schwach alkalischer Reaction, so kann wieder ein geringer Niederschlag von Tricalciumphosphat entstehen. Es wurde deshalb die Lösung vor der zweiten Fällung mit CaCl_2 filtrirt. Obwohl es demnach gleichfalls unwahrscheinlich war, dass das Präparat mit Calciumphosphat verunreinigt war, so habe ich dies jedoch auf folgende Weise näher zu ermitteln versucht:

Ungefähr 500 mg der trockenen Substanz wurden gemischt mit 15 ccm. 1%iger Essigsäure. Nachdem das Gemisch einige Zeit gestanden hatte, wurde durch ein aschenfreies Filter filtrirt; das Filtrat wurde alkalisch gemacht mittelst Ammoniak; es entstand dadurch kein Niederschlag; sodann wurde ein wenig Magnesiamixtur zugesetzt. Nach 24 Stunden war nur ein äusserst geringer, völlig unwägbarer Niederschlag entstanden. Die Verunreinigung mit Calciumphosphat konnte also praktisch ausser Betracht gelassen werden. Hiermit stimmt überein, dass der Calciumgehalt dieses Präparates (1,344%), innerhalb der Beobachtungsfehler, übereinstimmend gefunden wurde mit demjenigen des Calciumnucleohiston, welches vor der Fällung mit CaCl_2 mittelst Präcipitation durch Essigsäure und nachherigen Auswaschens mit Wasser von Phosphorsäure gereinigt worden war. (Es wurde hierbei 1,341% Ca gefunden, worüber unten Näheres.)

Im Natriumnucleohiston kann nur NaCl als Verunreinigung vorkommen, weil das NaCl mittelst Auswaschen mit Alkohol nicht genügend entfernt werden kann; einer geringen Menge NaCl im Präparate muss es demnach wahrscheinlich zugeschrieben werden, dass der Kohlenstoffgehalt der aschenhaltigen Substanz etwas niedriger gefunden wurde, als beim Calciumnucleohiston; dagegen stimmen die Resultate, wenn auf aschenfreie Substanz berechnet, nahezu überein.

Lilienfeld fand für den Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt des Nucleohiston im Mittel 48,46% C und 7% H.

Obwohl er dies nicht ausdrücklich erwähnt, so geht doch aus seiner Beschreibung hervor, dass die von ihm gefundenen Zahlen auf die aschenhaltige Substanz berechnet sind. Diese

Zahlen sind erheblich höher, als diejenigen, welche ich im Mittel für das Calciumnucleohiston fand, nämlich 45,31% C und 6,50% H.

Dieser Unterschied kann nicht nur der Verunreinigung des von Lilienfeld verwendeten Präparates mit Nucleoproteid zugeschrieben werden, wenn man in Betracht zieht, dass der Thymusauszug ungefähr vier Gewichtstheile Nucleohiston auf einen Gewichtstheil des Nucleoproteids enthält, während dieses Verhältniss im essigsauren Niederschlage ungefähr dasselbe sein muss. Nach meinen Bestimmungen enthält das Nucleoproteid 50% Kohlenstoff; berechnet man nun den Kohlenstoffgehalt eines Gemisches von vier Theilen Nucleohiston und einem Theile Nucleoproteid, so findet man 46,25% C, also 2,21% weniger, als von Lilienfeld gefunden wurde. Die Ursachen dieses Unterschieds sind, meines Erachtens, folgende:

Erstens war das von mir verwendete Nucleohiston eine Calciumverbindung, welche also ein etwas höheres Molekulargewicht besitzt, als das von Lilienfeld mit Essigsäure gefällte Nucleohiston; der Kohlenstoffgehalt der Calciumverbindung muss natürlich etwas niedriger sein. Der dadurch hervorgerufene Unterschied kann aber nicht 2,21% betragen, weil der Calciumgehalt des Calciumnucleohistons nur $1\frac{1}{3}$ % beträgt; dennoch würde das Nucleohiston, wenn das Calcium demselben entzogen war, ungefähr 0,6% Kohlenstoff mehr enthalten müssen; es wird dadurch der Unterschied von 2,21% auf 1,61% herabgesetzt.

Zweitens besteht die Möglichkeit, dass das von Lilienfeld bereitete Nucleohiston ausser dem Nucleoproteid noch anderes Eiweiss als Verunreinigung enthielt; fällt man nämlich den Thymusauszug mit Essigsäure, so ist die im Filtrate vorhandene Menge Eiweiss nur eine geringe und entspricht ohne Zweifel nicht 11,9% der totalen, im Thymusauszuge befindlichen Menge Eiweiss; bei einer zweiten Fällung mit Essigsäure ist die Menge Eiweiss im Filtrate noch geringer. Der essigsaurer Niederschlag reisst also Eiweiss mit und ist nur schwierig davon zu reinigen; es ist nun nicht unmöglich, dass dieses Eiweiss den Kohlenstoffgehalt des Präparates um

ein Geringes beeinflusst hat. Ein unmittelbarer Hinweis, dass bei der Fällung mit Essigsäure mancherlei Substanzen mitgefällt werden, ist darin gegeben, dass auch der braune Farbstoff des Thymusextractes vom essigsäuren Niederschlage mitgerissen wird; der Niederschlag wird dadurch bräunlich gefärbt, während das Filtrat wasserhell ist. Dahingegen ist das mittelst CaCl_2 gefällte Nucleohiston weiss und der braune Farbstoff verbleibt im Filtrate. Man kann nun zwar durch die spätere Behandlung mit Alkohol und Aether den braunen Farbstoff vollkommen aus dem essigsäuren Niederschlage entfernen, eine Verunreinigung mit Eiweiss wird aber auf diesem Wege gewiss nicht beseitigt werden.

Drittens ist es möglich, dass der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt von Lilienfeld thatsächlich etwas zu hoch gefunden wurde; eine von mir in einem genau nach der Lilienfeldschen Methode bereiteten Präparate ausgeführte Bestimmung gab als Resultat: 47,18% C und 6,84% H. Der Aschengehalt des Präparates war 2,527% und, auf die aschenfreie Substanz berechnet, findet man also 48,41% C und 7,02% H.

Lilienfeld fand im Mittel 48,46% C und 7% H. Sollte also Lilienfeld seine Zahlen auf die aschenfreie Substanz berechnet haben, welches aber aus seiner Beschreibung nicht hervorgeht, so stimmen die Resultate nahezu völlig überein, andernfalls besteht ein Unterschied von 1,28% C und 0,16% H.

Stickstoffbestimmungen.

Es wurden diese nach der Kjeldahl'schen Methode ausgeführt. Die Substanz wurde mit 10 ccm. eines Gemisches von 500 ccm. concentrirter Schwefelsäure und 100 g P_2O_5 unter Zusatz eines Tropfens Quecksilbers gekocht. Das Ammoniak wurde aufgefangen in $\frac{1}{4}$ n- H_2SO_4 . Als Indicator beim Titriren diente Methylorange. Es wurden immer dieselben Flüssigkeiten und womöglich davon auch dieselben Mengen benutzt. Drei vorher ausgeführte blinde Versuche führten zu ungefähr demselben Resultate; im Mittel wurde 0,8 ccm. $\frac{1}{4}$ n- H_2SO_4 verbraucht; bei der Angabe der Zahlen des verbrauchten $\frac{1}{4}$ n- H_2SO_4 ist dem Rechnung getragen worden.

a. Calciumnucleohiston, Präparat I.

0,4120 g trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks: 20,1 ccm. $\frac{1}{4}$ n- H_2SO_4 . Der Stickstoffgehalt war also 17,075 $\%$. Da der Aschengehalt dieses Präparates 7,008 $\%$ beträgt, so findet man für den Stickstoffgehalt, auf die aschenfreie Substanz berechnet: 18,363 $\%$.

b. Magnesiumnucleohiston.

0,4583 g trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 22,05 ccm. $\frac{1}{4}$ n- H_2SO_4 . Der Stickstoffgehalt war also 16,839 $\%$,

0,4366 g trockene Substanz lieferten 0,0376 g Asche; der Aschengehalt dieses Präparats war also 8,383 $\%$. Berechnet auf die aschenfreie Substanz, findet man demnach für den Stickstoffgehalt 18,379 $\%$.

Das Magnesiumnucleohiston enthält wahrscheinlich als Verunreinigung eine geringe Menge $MgSO_4$, weil dieses Salz bei dem Auswaschen mit Alkohol nicht genügend entfernt wird. Hiermit stimmt überein, dass der Stickstoffgehalt etwas niedriger ist, als beim Calciumnucleohiston gefunden wurde, während die Resultate, berechnet auf die aschenfreie Substanz, nahezu übereinstimmen.

Lilienfeld fand für den Stickstoffgehalt seiner Substanz 16,86 $\%$, also 0,22 $\%$ weniger, als für das Calciumnucleohiston gefunden wurde; bei der Beurtheilung dieses Unterschiedes ist wiederum in Betracht zu ziehen, dass das Präparat Lilienfeld's verunreinigt war mit Nucleoproteid, wahrscheinlich auch mit anderem Eiweiss, und weiterhin, dass seine Substanz keine Calciumverbindung war.

Phosphorbestimmungen.

Zur Phosphorbestimmung wurde die Substanz nach der von Neumann¹⁾ angegebenen Methode mit Salpeter- und Schwefelsäure oxydirt. Die freigewordene Phosphorsäure wurde mit Molybdänmischung unter Zusatz von NH_4NO_3 gefällt; der Niederschlag wurde in der gewöhnlichen Weise gelöst und mit Magnesiummischung gefällt, sodann als $Mg_2P_2O_7$ gewogen.

a. Calciumnucleohiston, Präparat I.

1) 0,4069 g trockene Substanz gaben:

0,0550 g $Mg_2P_2O_7$ = 3,775 $\%$ P.

2) 0,4067 g trockene Substanz gaben:

0,0529 g $Mg_2P_2O_7$ = 3,633 $\%$ P.

¹⁾ Archiv f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abth.) 1900, S. 159.

b. Calciumnucleohiston, Präparat II.

0.4071 g trockene Substanz gaben:

0,0560 g $Mg_2P_2O_7$ = 3,842 % P.

Es ist schon oben gesagt worden, dass der Gehalt des Calciumnucleohistons, Präparat I, an freien Phosphaten nur so äusserst gering war, dass diese Menge ausser Betracht gelassen werden konnte. Dasselbe Resultat wurde in einer ähnlichen Weise für das Calciumnucleohiston, Präparat II, erhalten.

Im Mittel wurde der Phosphorgehalt des Calciumnucleohistons also zu 3,750 % gefunden. Lilienfeld fand für seine Substanz im Mittel 3,025 %; hält man im Auge, dass diese Substanz zu ungefähr $\frac{1}{5}$ aus Nucleoproteid bestand, welches nach meinen Bestimmungen ± 1 % P enthält, so stimmen die von Lilienfeld und von mir gefundenen Resultate gut überein.

Schwefelbestimmungen.

Hierzu wurde die Substanz vorher mit Salpetersäure oxydirt, sowie es von Hammarsten¹⁾ angegeben worden ist; es wurde dabei aber folgende Modification angewendet: An Stelle des Erhitzens der Substanz in einem Becherglase auf dem Wasserbade wurde dieselbe im Kjeldahlkolben mit Salpetersäure über einer kleinen Flamme sanft gekocht, während mittelst fortwährenden Zuträufelnlassens von Salpetersäure dafür gesorgt wurde, dass die Menge Salpetersäure ungefähr constant blieb (± 10 ccm.) und also keine Gefahr vorhanden war, dass Schwefelsäure entweichen konnte. Wenn die Oxydation soweit fortgeschritten war, dass sich keine rothen Dämpfe mehr bildeten, wurde die Salpetersäure vorsichtig bis auf 6—7 ccm. abgedampft. Dem Gemisch im Kolben wurde darauf soviel Natriumcarbonat zugesetzt, dass die Reaction alkalisch wurde und die Flüssigkeit eine braune Farbe bekam. Dieselbe wurde sodann im Platintiegel bis zur Trockne abgedampft und der Rückstand über einer Spiritusflamme verbrannt. Die Asche wurde in Wasser gelöst und die Lösung zweimal mit einem grossen Ueberschuss von Salzsäure bis zur Trockne abgedampft. Die Oxydation des Nucleohistons, sowie des Nucleo-

1) Diese Zeitschr., Bd. VII, S. 227; Bd. IX, S. 273.

proteids mit Salpetersäure kann in dieser Weise innerhalb weniger Stunden beendet werden, wobei die Flüssigkeit nicht spritzt und also keine Unannehmlichkeiten verursacht werden.

a. Calciumnucleohiston, Präparat I.

0,8437 g trockene Substanz gaben:

$$0,0308 \text{ g BaSO}_4 = 0,501 \text{ ‰ S.}$$

b. Calciumnucleohiston, Präparat II.

0,7992 g trockene Substanz gaben:

$$0,0301 \text{ g BaSO}_4 = 0,517 \text{ ‰ S.}$$

Das Calciumnucleohiston enthält also im Mittel 0,509 ‰ S.

Das Nucleoproteid enthält nach meinen Bestimmungen 1,19 ‰ S. Lilienfeld fand für seine Substanz 0,701 ‰ S; war davon $\frac{1}{5}$ Nucleoproteid, so stimmen die Resultate vorzüglich überein.

Calciumbestimmungen.

Hierzu wurde das Calciumnucleohiston gut gemischt mit 5 ‰iger Essigsäure; nachdem das Gemisch 1 bis 2 Stunden stehen gelassen war, wurde durch ein aschenfreies Filter filtrirt. Das Filter mit der Substanz wurde mit 5 ‰iger Essigsäure ausgewaschen, bis das Filtrat mit Kaliumoxalat auch nach 24 Stunden keine Kalkreaction gab. Es stellte sich heraus, dass dies schon nach zweimaliger Auswaschung der Fall war. Das Filter wurde demnach zweimal mit 5 ‰iger Salzsäure ausgewaschen, während das dritte Washwasser als Kontrollflüssigkeit benutzt wurde und mit Kaliumoxalat, nachdem die saure Reaction mit Ammoniak abgestumpft worden war, nach 24 Stunden keinen Niederschlag gab. Zur Entscheidung, ob alles Calcium aus der Substanz verschwunden war, wurde dieselbe bei jeder Bestimmung mit dem Filter verbrannt; die Asche wurde mit Salzsäure ausgekocht; nachdem diese Flüssigkeit mit Ammoniak alkalisch gemacht und sodann mit Essigsäure schwach angesäuert worden war, wurde filtrirt; das Filtrat gab mit Kaliumoxalat nach 24 Stunden keinen Niederschlag.

Man hätte das Calciumnucleohiston auch unmittelbar verbrennen können, um darauf den Calciumgehalt der in Salz-

säure gelösten Asche zu bestimmen. Einige in dieser Weise ausgeführte Bestimmungen stimmten jedoch nicht überein; der Calciumgehalt wurde immer zu niedrig gefunden; es muss dies dem Umstande zugeschrieben werden, dass die Asche des Calciumnucleohistons, auch beim längeren Kochen mit Salzsäure, sich nur theilweise löst; ein Theil des Calciums kann also in der Asche unaufgeschlossen und ungelöst bleiben.

a. Calciumnucleohiston, Präparat I.

0,8028 g trockene Substanz gaben:

$$0,0151 \text{ g CaO} = 1,344\% \text{ Ca.}$$

b. Calciumnucleohiston, Präparat II.

0,3991 g trockene Substanz gaben:

$$0,0074 \text{ g CaO} = 1,324\% \text{ Ca.}$$

Es ist bereits darauf hingewiesen worden, dass diese Präparate eine äusserst geringe Menge freies Phosphat, wahrscheinlich Calciumphosphat, enthielten; es schien mir deshalb geboten, noch eine Kontrollbestimmung des Calciumgehalts auszuführen; das Calciumnucleohiston wurde zu diesem Zweck auf folgende Weise bereitet: Der Thymusauszug wurde mit Essigsäure gefällt; der Niederschlag, behufs Entfernung der Phosphorsäure, zweimal mit einer reichlichen Menge Wasser ausgewaschen und darauf in Wasser unter Zusatz von möglichst wenig Ammoniak gelöst; aus dieser Lösung wurde das Nucleohiston gefällt mit CaCl_2 ; der Niederschlag wurde mit Alkohol ausgewaschen, bis der Waschalkohol kein CaCl_2 mehr enthielt, und schliesslich unter Aether gebracht und getrocknet. Weil nur einmal mit CaCl_2 gefällt wurde, so war in dieser Substanz wahrscheinlich noch ein wenig Nucleoproteid vorhanden; es wird aber gezeigt werden, dass der Calciumgehalt des Nucleoproteids innerhalb der Beobachtungsfehler übereinstimmt mit demjenigen des Nucleohistons, sodass diese geringe Menge Nucleoproteid keinen Fehler verursachen konnte.

Der Calciumgehalt wurde wieder in der oben angegebenen Weise mittelst Extraction mit 5%iger Essigsäure bestimmt.

0,7563 g trockene Substanz gaben:

$$0,0142 \text{ g CaO} = 1,341\% \text{ Ca.}$$

Bei den vorigen Bestimmungen war gefunden worden: 1,344 und 1,324^o/_o Ca; es stimmen diese Zahlen also mit dem zuletzt gefundenen Werthe sehr gut überein, so dass die Verunreinigung der beiden Calciumnucleohistonpräparate mit Calciumphosphat zu gering war, um die Bestimmungen zu beeinflussen. Bei der Berechnung ist das Atomgewicht des Calciums zu 40 angenommen worden.

Im Mittel wurde also für den Calciumgehalt gefunden: 1,336^o/_o Ca.

Natriumbestimmung.

Es ist bereits gesagt worden, dass es möglich ist, das mit Essigsäure gefällte Nucleohiston mit Wasser auszuwaschen, bis das Waschwasser neutral reagirt. Mittelst Zusatz von Alkali kann dann der Niederschlag wieder gelöst werden, ohne dass die Reaction alkalisch wird. Wäre die Menge Alkali, z. B. Natronlauge, welche zur Lösung erforderlich war, bekannt, so könnte daraus der Natriumgehalt des Natriumnucleohistons berechnet werden.

Diese Menge habe ich folgenderweise zu bestimmen versucht.

Aus dem Thymusauszuge wurde das Nucleohiston gefällt mit Chlorcalcium; der Niederschlag wurde gelöst in Wasser unter Zusatz von ein Paar Tropfen verdünnten Ammoniaks und die Lösung wieder mit Essigsäure gefällt, wodurch das Calciumnucleohiston zerlegt und freies Nucleohiston gebildet wird. Dieser Niederschlag wurde mit destillirtem Wasser ausgewaschen, bis die Reaction des Waschwassers neutral geworden war; sicherheitshalber wurde die Lösung nochmals mit einer reichlichen Menge Wasser ausgewaschen, nachdem mit Lackmuspapier keine saure Reaction mehr im Waschwasser nachgewiesen werden konnte. Der Niederschlag wurde sodann in ein gewogenes Becherglas gebracht und mit destillirtem Wasser gemischt bis zu einem Volumen von 225 ccm. Darauf wurde aus einer Burette $\frac{1}{10}$ n-NaOH zugesetzt unter Umrühren des Gemisches. Zur Beobachtung des Auftretens der alkalischen Reaction diente ein Tropfen Phenolphthalein; die Menge des noch ungelösten Nucleohistons kann als Maass dafür dienen, wieviel Alkali noch zugesetzt werden muss. Die alkalische Reac-

tion wurde sichtbar nach dem Zusatz von 17,3 ccm. $\frac{1}{10}$ n-NaOH. Mit empfindlichem Lackmuspapier wurde zugleich noch das Auftreten der alkalischen Reaction kontrollirt. In 225 ccm. des letzten Waschwassers wurde die rothe Farbe mit Phenolphthalein sichtbar nach einem Zusatz von 0,15 ccm. $\frac{1}{10}$ n-NaOH; zur Lösung des Nucleohistons waren also verbraucht worden 17,15 ccm. $\frac{1}{10}$ n-NaOH. Diese Lösung wurde nun im vorher gewogenen Becherglas bis zur Trockne abgedampft und sodann bei 110° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet. Aus der Gewichtsvermehrung des Glases ergab sich, dass darin 2,4902 g Natriumnucleohiston vorhanden waren (die geringe Menge, welche in Verlust gerathen war, weil einige Male Lackmuspapier in die Flüssigkeit eingetaucht worden war, sowie das Trockengewicht des Tropfens Phenolphthalein sind ausser Betracht gelassen).

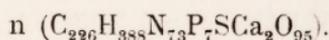
2,4902 g Natriumnucleohiston enthält also soviel Natrium, als vorhanden in 17,15 ccm. $\frac{1}{10}$ n-NaOH; es ist das demnach 39,445 mg, woraus hervorgeht, dass das Natriumnucleohiston 1,584% Natrium enthält; dieser Gehalt stimmt überein mit 1,374% Calcium, während bei der direkten Calciumbestimmung 1,336% Ca gefunden wurde.

Die Zusammensetzung des Calciumnucleohistons war also im Mittel:

C = 45,31%; H = 6,50%; N = 17,075%; P = 3,750%;
S = 0,509%; Ca = 1,336%.

Da die Calciumbestimmungen sehr gut übereinstimmende Resultate lieferten, so eignen sich dieselben zur Berechnung des Molekulargewichts des Nucleohistons. Setzt man voraus, dass das Nucleohiston ein Atom Calcium enthält, so wird das Molekulargewicht 2987. Aus dem Schwefelgehalte geht aber hervor, dass das thatsächliche Molekulargewicht einem Vielfachen dieser Zahl entsprechen muss; bei einem Molekulargewicht von 5974 stimmt 0,509% S ungefähr überein mit einem Atom Schwefel.

Mit der Zahl 5974 als Grundlage findet man also als empirische Formel des Nucleohistons:



Es ist möglich, dass das Molekül Nucleohiston überdies Eisen enthält. In diesem Falle würde nur die Sauerstoffzahl abgeändert werden müssen.

Zusammensetzung des Nucleoproteids.

Die Zusammensetzung des Nucleoproteids weicht erheblich von derjenigen des Nucleohistons ab. Für die Elementaranalyse wurde das Nucleoprotein folgender Weise bereitet.

Nachdem das Nucleohiston mittelst CaCl_2 aus dem Thymusauszuge gefällt worden war, wurde aus dem Filtrate das Nucleoprotein mittelst Essigsäure gefällt; der Niederschlag wurde mit ungefähr der halben Menge Wasser gemischt, worin derselbe vor der Fällung mit Essigsäure gelöst vorhanden war, und darauf mittelst Zusatz von möglichst wenig Ammoniak gelöst; die Lösung wurde filtrirt. Mittelst CaCl_2 konnte aus dieser Lösung ein Theil gefällt werden; der Niederschlag wurde abcentrifugirt und mit Alkohol ausgewaschen, bis der Waschalkohol kein CaCl_2 mehr enthielt; sodann wurde dieses Calciumnucleoprotein unter Aether gebracht und getrocknet.

Derjenige Theil des Nucleoproteids, welcher bei der Fällung mit CaCl_2 gelöst blieb, wurde wieder gefällt mit Essigsäure; der Niederschlag, welcher immer grösser war, als die mit CaCl_2 hervorgerufene Fällung, wurde mit Alkohol und Aether ausgewaschen und getrocknet.

Es geht aus dieser Bereitungsmethode hervor, dass für eine Verunreinigung der Präparate mit Salzen keine Gefahr vorhanden war.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen.

a) Calciumnucleoprotein, Präparat I.

0,4018 g trockene Substanz gaben:

0,7357 g CO_2 = 49,93 % C

0,2564 g H_2O = 7,09 % H.

0,4942 g trockene Substanz lieferten 0,0187 g Asche; der Aschengehalt dieses Präparates war also 3,784 % und auf aschefreie Substanz berechnet findet man: 51,90 % C und 7,37 % H.

b) Calciumnucleoproteid, Präparat II.

0,4076 g trockene Substanz gaben:

0,7427 g CO_2 = 49,71 % C

0,2744 g H_2O = 7,48 % H.

0,4202 g trockene Substanz lieferten 0,0174 g Asche; der Aschengehalt war also 4,141 % und auf die aschenfreie Substanz berechnet findet man: 51,84 % C und 7,80 % H.

c) Mit Essigsäure gefälltes Nucleoproteid, Präparat I.

0,3555 g trockene Substanz gaben:

0,6518 g CO_2 = 50,00 % C

0,2315 g H_2O = 7,24 % H.

0,4145 g trockene Substanz lieferten 0,0134 g Asche; der Aschengehalt war also 3,233 %; somit findet man für die aschefreie Substanz: 51,68 % C und 7,48 % H.

d) Mit Essigsäure gefälltes Nucleoproteid, Präparat II.

0,3875 g trockene Substanz gaben:

0,7128 g CO_2 = 50,17 % C

0,2486 g H_2O = 7,12 % H.

0,3945 g trockene Substanz lieferten 0,0118 g Asche; der Aschengehalt war also 2,991 %; somit findet man für die aschenfreie Substanz: 51,72 % C und 7,35 % H.

Im Mittel wurde also für das Calciumnucleoproteid gefunden: 49,82 % C und 7,29 % H.

Das mit Essigsäure gefällte Nucleoproteid enthielt im Mittel: 50,09 % C und 7,18 % H.

Der Kohlenstoffgehalt des Calciumnucleoproteids war somit etwas niedriger, als derjenige des mit Essigsäure gefällten Nucleoproteids. Es findet das seine Erklärung darin, dass das Calciumnucleoproteid eine Calciumverbindung darstellt, während dieselbe bei dem mit Essigsäure gefällten Nucleoproteide zerlegt worden ist. Dass ein derartiger Unterschied nicht beim Wasserstoffgehalte beobachtet werden kann, muss dem abnorm hohen Wassergehalte der Bestimmung b zugeschrieben werden.

*Stickstoffbestimmungen.*¹⁾

a) Calciumnucleoproteid, Präparat I.

0,4085 g trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks: 18,5 ccm. $\frac{1}{4}$ n- H_2SO_4 . Der Stickstoffgehalt war also 15,851 %. Berechnet auf die aschenfreie Substanz findet man: 16,476 %.

¹⁾ Ausgeführt, sowie es beim Nucleohiston angegeben worden ist.

b) Mit Essigsäure gefälltes Nucleoproteid, Präparat I.

0,4671 g trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks: 21,5 ccm. $\frac{1}{4}$ n-H₂SO₄. Der Stickstoffgehalt war also 16,110 %/o. Berechnet auf die aschenfreie Substanz findet man: 16,648 %/o.

Der Stickstoffgehalt des Calciumnucleoproteids ist also etwas niedriger, als derjenige des mit Essigsäure gefällten Nucleoproteids; es entspricht dies somit der Vorstellung, dass ersteres eine Calciumverbindung darstellt.

Phosphorbestimmungen.¹⁾

a) Calciumnucleoproteid, Präparat I.

0,9463 g trockene Substanz gaben:

$$0,0319 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,941 \text{ \% P.}$$

b) Mit Essigsäure gefälltes Nucleoproteid, Präparat I.

1,0551 g trockene Substanz gaben:

$$0,0365 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,966 \text{ \% P.}$$

Der Phosphorgehalt des Calciumnucleoproteids muss natürlich etwas niedriger ausfallen, als derjenige des mit Essigsäure gefällten Nucleoproteids. Bei der Berechnung stellt es sich jedoch heraus, dass dieser Unterschied gänzlich innerhalb der Beobachtungsfehler bleibt. Als durchschnittlicher Phosphorgehalt des Nucleoproteids kann also aus den beiden obenstehenden Bestimmungen 0,954 %/o P angegeben werden.

Schwefelbestimmungen.²⁾

a) Calciumnucleoproteid, Präparat I.

0,7836 g trockene Substanz gaben:

$$0,0703 \text{ g BaSO}_4 = 1,232 \text{ \% S.}$$

b) Mit Essigsäure gefälltes Nucleoproteid, Präparat I.

0,8486 g trockene Substanz gaben:

$$0,0706 \text{ g BaSO}_4 = 1,145 \text{ \% S.}$$

Ebenso wie bei den Phosphorbestimmungen bleibt auch hier der Unterschied, welcher theoretisch zwischen dem Schwefelgehalte des Calciumnucleoproteids und demjenigen des mit

1) Ausgeführt, sowie es beim Nucleohiston angegeben worden ist.

2) Ausgeführt, sowie es beim Nucleohiston angegeben worden ist.

Essigsäure gefällten Nucleoproteids bestehen muss, gänzlich innerhalb der Beobachtungsfehler.

Im Mittel kann also der Schwefelgehalt des Nucleoproteids zu 1,188 % angegeben werden.

Calciumbestimmungen.

Zur Bestimmung des Calciumgehalts wurde das Nucleoprotein im Porzellantiegel verbrannt. Die Asche löste sich leicht beim Kochen mit Salzsäure. Die Flüssigkeit wurde nun mit Ammoniak alkalisch gemacht, sodann schwach mit Essigsäure angesäuert; darauf wurde filtriert und das Filter mit destillirtem Wasser ausgewaschen. Das Calcium wurde mit Kaliumoxalat gefällt und als CaO gewogen.

a) Calciumnucleoprotein. Präparat I.

0,4942 g trockene Substanz gaben:

0,0092 g CaO = 1,330 % Ca.

b) Calciumnucleoprotein, Präparat II.

0,4202 g trockene Substanz gaben:

0,0079 g CaO = 1,343 % Ca.

Im Mittel wurde also gefunden: 1,337 % Ca.

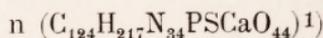
Diese Zahl stimmt nahezu völlig überein mit derjenigen, welche beim Calciumnucleohiston erhalten wurde, nämlich 1,336 %.

Für die Zusammensetzung des Calciumnucleoproteids wurde also im Mittel gefunden:

C = 49,82 %, H = 7,29 %, N = 15,851 %, P = 0,954 %, S = 1,188 %, Ca = 1,337 %.

Der Calciumgehalt kann auch hier wieder zur Berechnung des Molekulargewichts verwendet werden. Enthält das Nucleoprotein ein Atom Calcium, so findet man, als Minimalzahl, 2980. Dieser Zahl entsprechen ungefähr ein Atom Schwefel und ein Atom Phosphor.

Mit der Zahl 2980 als Grundlage findet man also als empirische Formel des Nucleoproteids:



1) In Bezug auf möglich im Molekül vorhandenes Eisen gilt das beim Nucleohiston Gesagte.

Zur besseren Uebersichtlichkeit gebe ich hier eine kurze Zusammenstellung der Analysenzahlen.

Nucleohiston.

	Aschenhaltige Substanz							Aschenfreie Substanz		
	C	H	N	P	S	Ca	Na	C	H	N
Ca-Nh. I . . .	45,25	6,41	17,075	3,775	0,501	1,344	—	48,66	6,90	18,363
	45,37	6,59	—	3,633	—	—	—	48,80	7,08	—
Ca-Nh. II . . .	—	—	—	3,842	0,517	1,324	—	—	—	—
Ca-Nh. III . . .	—	—	—	—	—	1,341	—	—	—	—
Na-Nh. . . .	44,42	6,46	—	—	—	—	1,584	48,92	7,12	—
Mg-Nh. . . .	—	—	16,839	—	—	—	—	—	—	18,379

Nucleoproteid.

	Aschenhaltige Substanz						Aschenfreie Substanz		
	C	H	N	P	S	Ca	C	H	N
Ca-Np. I	49,93	7,09	15,851	0,941	1,232	1,330	51,90	7,37	16,476
Ca-Np. II	49,71	7,48	—	—	—	1,343	51,84	7,80	—
Essigs. Np. I . . .	50,00	7,24	16,110	0,966	1,145	—	51,68	7,48	16,648
Essigs. Np. II . . .	50,17	7,12	—	—	—	—	51,71	7,35	—

Die Wirkung des Nucleohistons und des Nucleoproteids als Fibrinferment.

Von Lilienfeld wird angegeben, dass das mit Essigsäure gefällte Nucleohiston Fibrinogen enthaltende Flüssigkeiten nicht zur Gerinnung zu bringen vermag. Wohl aber kann nach ihm das Nucleohiston vom Fibrinogen Thrombosin abspalten, welches sich mit Calcium- oder Baryumsalzen verbindet und dadurch in Fibrin übergeht.

Nachdem aber Hammarsten¹⁾ dargethan hatte, dass Fibrin keine Calciumverbindung darstellt, und Cramer²⁾ die

1) Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 333; Bd. XXVIII, S. 98.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXIII, S. 74.

Identität von Thrombosin mit Fibrinogen erwiesen hatte, konnte man es als gesichert betrachten, dass die Calciumsalze nicht in der von Lilienfeld angegebenen Weise die Gerinnung beeinflussen.

Andererseits hatten Arthus und Pagès gezeigt, dass Calciumsalze zur Gerinnung erforderlich waren.

Schon bevor Lilienfeld seine Gerinnungstheorie aufgestellt hatte, war von Pekelharing¹⁾ gefunden worden, dass die Kalksalze zur Bildung des Fibrinferments aus dem Zymogen erforderlich waren. Er fasste das Ferment als eine Kalkverbindung des Zymogens auf und wies nach, dass das Zymogen aus dem Blute ein Nucleoproteid war. Sodann zeigte er, dass auch andere Nucleoproteide, u. A. die mittelst Essigsäure aus dem Thymusauszuge gefällte Substanz, mit Hülfe von Kalksalzen Gerinnung hervorzurufen im Stande waren, ohne Kalksalze aber das Fibrinogen nicht merkbar änderten. Das in der Thymus enthaltene Zymogen schien also auch wieder, indem es sich mit Calcium verband, in Ferment übergehen zu können.

Die Meinung, dass die Nucleoproteide des Thymusauszuges sich mit Calcium zu verbinden vermögen, kann nach dem im Vorhergehenden Gesagten nicht mehr bezweifelt werden. Wie schon bemerkt wurde, war von Pekelharing gefunden worden, dass diese Verbindung Gerinnung hervorrufen kann.

Bei einer Wiederholung dieser Versuche, welche ich unternahm, um die Bedeutung der Calciumsalze näher kennen zu lernen, stellte es sich heraus, dass für die Wirksamkeit der Nucleoproteide der Thymusdrüse ein bestimmter Gehalt an Calciumsalz als Optimum zu betrachten ist.

Zum Beweise mögen folgende Versuche aufgeführt werden: Es wurden in einem Reagensröhrchen immer 2 ccm. des Thymusauszuges gemischt mit 4 ccm. der Fibrinogenlösung, welche mit CaCl_2 für sich allein nicht gerann; sodann wurden verschiedene Mengen CaCl_2 zugesetzt. Immer wurden derselbe Thymusauszug und dieselbe Fibrinogenlösung benutzt. Die Gemische wurden im Wasserbade bei 37° gehalten.

1) Untersuchungen über das Fibrinferment. Amsterdam 1892.

- | | | |
|---|---|--|
| a) 2 ccm. des Extractes
4 ccm. Fibrinogen | } | Keine Gerinnung. |
| b) 2 ccm. des Extractes
4 ccm. Fibrinogen
2 Tropfen 1% CaCl_2
(1 Tropfen = 0,06 ccm.) | | |
| c) 2 ccm. des Extractes
4 ccm. Fibrinogen
1 Tropfen 10% CaCl_2 | } | Vollständige Gerinnung nach
1½ Stunden. |
| d) 2 ccm. des Extractes
4 ccm. Fibrinogen
3 Tropfen 10% CaCl_2 | | |
| e) 2 ccm. des Extractes
4 ccm. Fibrinogen
5 Tropfen 10% CaCl_2 | } | Nach 3 Stunden war das Gemisch
noch flüssig; nach \pm 18 Stunden
hatte sich ein nicht sehr festes
Gerinnsel gebildet. |
| f) 2 ccm. des Extractes
4 ccm. Fibrinogen
8 Tropfen 10% CaCl_2 | | |
| g) 2 ccm. des Extractes
4 ccm. Fibrinogen
12 Tropfen 10% CaCl_2 | } | Das Gemisch bleibt flüssig. |
| | | |

Dass es in den letzten zwei Fällen nicht die Erhöhung des Salzgehaltes war, welche die Gerinnung verhinderte, erhellt noch aus folgendem Versuche.

- | | | |
|---|---|---------------------------------|
| 2 ccm. des Extractes
4 ccm. Fibrinogen
1 Tropfen 10% CaCl_2
4 Tropfen gesättigter
Kochsalzlösung | } | Gerinnung nach \pm 3 Stunden. |
| | | |

Aus dem Volumen der verwendeten Gemische und den bekannten Mengen CaCl_2 , welche zugesetzt wurden, kann berechnet werden, dass die Gerinnung mittelst des Thymusauszuges am besten und am raschesten stattfindet bei einem Gehalt von 0,1 bis 0,3% CaCl_2 , dass fernerhin die Gerinnung bei einem Gehalt von \pm 0,5% CaCl_2 erheblich verzögert wird und bei einem Gehalt von \pm 0,8% CaCl_2 ganz unterbleibt.

Zu den erwähnten Versuchen wurde der unveränderte Thymusauszug benutzt; ich habe nun auch für das Nucleohiston und das Nucleoproteid die Fähigkeit, Gerinnung hervor-

zurufen, für sich gesondert untersucht. Ueberdies habe ich mich davon überzeugt, dass die Eiweisskörper, welche ausser dem Nucleohiston und dem Nucleoproteid im Thymusauszuge vorhanden sind, keine die Gerinnung hemmende oder fördernde Eigenschaften besitzen.

Wird das Nucleohiston zweimal gefällt mit 0,1%igem CaCl_2 und eine geringe Menge des Niederschlages mit einigen Cubikcentimetern Fibrinogen gemischt, so löst sich das Nucleohiston wegen des Kochsalzgehaltes des Fibrinogens und nach einiger Zeit tritt die Gerinnung auf; auch hier aber zeigt es sich wiederum, dass die Gerinnung rascher und vollständiger stattfindet, wenn das Gemisch ungefähr 0,1% CaCl_2 enthält.

Die zuverlässigste Methode zur Bereitung von Fibrinferment aus Nucleohiston ist also wohl diese, dass man das Nucleohiston mit 0,1% CaCl_2 fällt, sodann eine geringe Menge des Niederschlages mit der Fibrinogenlösung mischt und darauf soviel CaCl_2 zusetzt, bis das Gemisch \pm 0,1% CaCl_2 enthält. (Die geringe Menge CaCl_2 , welche zugleich mit dem Nucleohiston in das Gemisch eingeführt wird, kann, wenn wenigstens nicht allzu viel Nucleohiston gebraucht wird, vernachlässigt werden.)

Wenn man das Nucleohiston aus dem Thymusauszuge mittelst CaCl_2 entfernt, sodann aus dem Filtrate das Nucleoproteid mit Essigsäure fällt und den Niederschlag mit möglichst wenig Ammoniak löst, so vermag diese Lösung mit Hülfe von Calciumsalzen Gerinnung hervorzurufen; ein Gehalt von \pm 0,1% CaCl_2 ist auch hier als Optimum zu betrachten.

Das mittelst 0,2% MgSO_4 oder 0,9% NaCl gefällte Nucleohiston vermag ohne Zusatz von Kalksalzen keine Gerinnung hervorzurufen.

Aus dem Obenstehenden geht demnach hervor, dass der Thymusauszug und die darin enthaltenen Nucleoproteide als Fibrinferment am wirksamsten sind, wenn die Gerinnungsflüssigkeit 0,1 bis 0,3% CaCl_2 enthält; es ist das gerade diejenige Concentration des Chlorcalciums, durch welche das Nucleohiston vollständig, das Nucleoproteid wenigstens möglichst vollständig, aus einer übrigens salzfreien Lösung gefällt werden;

dagegen wird ihre Wirksamkeit erheblich verringert bei einem Gehalt von 0,5%, derjenigen Concentration also, bei welcher das Nucleohiston gerade noch ungelöst bleibt oder vielleicht schon sich zu lösen anfängt. Bei einem Gehalt von \pm 0,8% oder mehr CaCl_2 findet keine Gerinnung statt: bei diesem Gehalt wird das Nucleohiston in einem übrigens salzfreien Gemische wenigstens theilweise wieder gelöst.

Von Pekelharing wurde das Fibrinferment aus Rinderblutserum bereitet, mittelst Verdünnung desselben mit Wasser und nachheriger Fällung mit Essigsäure. Es wurde soviel Essigsäure zugesetzt, dass das Serumglobulin sich wieder löste: das Zymogen des Ferments, ein Nucleoproteid, bleibt dann noch gefällt und kann in Wasser mit einer Spur Alkali gelöst werden.

Ich habe untersucht, ob aus der so erhaltenen Lösung das Nucleoproteid mittelst CaCl_2 gefällt werden kann; es war dies der Fall; ebenso wie das Nucleohiston, wird das Nucleoproteid aus Blutserum am besten bei einem Gehalt von 0,1% CaCl_2 gefällt.¹⁾ Der Niederschlag ist in Wasser unter Zusatz von ein Paar Tropfen von verdünntem Ammoniak löslich. Aus dieser Lösung kann das Nucleoproteid wieder mittelst CaCl_2 gefällt werden. Der Niederschlag löst sich in 0,2% iger HCl und gibt bei der Behandlung mit Pepsin und Salzsäure nach etwa 48 Stunden einen allerdings nicht sehr grossen Niederschlag.

Zur Untersuchung, ob die mit CaCl_2 gefällte Substanz Phosphor enthielt und ob dieselbe eine Calciumverbindung darstelle, habe ich dieselbe auf folgende Weise bereitet.

Rinderblutserum wurde mit zwei Volumina Wasser verdünnt: sodann wurde das Nucleoproteid mit Essigsäure gefällt und der Niederschlag in Wasser mit möglichst wenig Ammoniak gelöst. Die Lösung wurde filtrirt und aus dem Filtrate das Nucleoproteid durch CaCl_2 gefällt, der Niederschlag wurde in Wasser unter Zusatz von ein Paar Tropfen verdünnten Ammoniaks gelöst, die Lösung filtrirt und das Filtrat wieder mit CaCl_2 gefällt. Darauf wurde der Niederschlag mit Alkohol

1) Diese Fällung ist aber nicht vollständig.

ausgewaschen, bis der Waschalkohol kein CaCl_2 mehr enthielt, sodann unter Aether gebracht und getrocknet.

Diese Substanz wurde mit Kaliumnitrat und Natriumcarbonat verascht; in der Asche konnte Phosphor nachgewiesen werden. Der Phosphorgehalt scheint aber gering zu sein.

In Bezug auf den Calciumgehalt erhielt ich folgendes Resultat:

0,4802 g trockene Substanz wurden verbrannt; das Gewicht der Asche betrug 0,0089 g, der Aschengehalt somit 1,853%. Die Asche löste sich vollständig beim Kochen mit Salzsäure und lieferte 0,0043 g CaO . Der Calciumgehalt war also 0,639%.

Von Hammarsten¹⁾ ist angegeben worden, dass das Serumglobulin aus seiner neutralen, wässerigen Lösung von sehr geringen Salzmengen gefällt wird, um sich dann im Ueberschusse zu lösen. Ein derartiges Verhalten wurde hier für das Nucleoproteid gefunden. Die Mittheilungen Hammarsten's wurden aber gemacht, bevor die Untersuchungen Pekelharing's die Existenz eines Nucleoproteids im Blutserum nachgewiesen hatten. Es ist nun allerdings möglich, dass auch das Serumglobulin von geringen Salzmengen gefällt wird, und in diesem Falle wäre die von mir erhaltene Substanz nicht als reines Nucleoproteid zu betrachten, weil die Trennung vom Globulin mittelst einmaliger Fällung mit Essigsäure nicht vollständig ist. Dass jedoch diese Substanz Nucleoproteid enthält, erscheint mir nach dem oben Gesagten sicher gestellt.

In Ueberschuss von CaCl_2 löst sich das mit CaCl_2 gefällte Nucleoproteid aus Blutserum etwas leichter, als das Nucleohiston. Die Lösung beginnt nämlich bereits bei einem Gehalte von 0,3 bis 0,4% CaCl_2 , während bei einem Gehalt von 0,8% CaCl_2 die Lösung eine vollständige ist.

BaCl_2 und MgSO_4 vermögen, ebenso wie CaCl_2 , das Nucleoproteid zu fällen. Auch durch NaCl wird ein Niederschlag hervorgerufen.

1) Pflüger's Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 18, S. 38, 1880.

Die Gerinnung mittelst des Ferments aus dem Blute wird von dem Gehalte an Calciumsalzen in derselben Weise beeinflusst, wie es beim Nucleohiston gefunden wurde.

Folgender Versuch wird dies näher erweisen:

900 ccm. Rinderblut wurden in 100 ccm. 10⁰/₁₀igem CaCl₂ aufgefangen; das Blut blieb flüssig; der Gehalt an CaCl₂ war ungefähr 1⁰/₁₀. Die totale Menge Salz im Blute betrug demnach \pm 1,9⁰/₁₀. Bei diesem Salzgehalte vermag übrigens das Blut noch sehr wohl zu gerinnen. Sicherheitshalber wurden aber 900 ccm. Blut desselben Rindes in 30 ccm. gesättigter Kochsalzlösung, welche mit Wasser bis auf 100 ccm. angefüllt waren, aufgefangen. Dieses Blut gerann in der gewöhnlichen Weise, obgleich der Salzgehalt ebenso gross war, wie derjenige des in Chlorcalciumlösung aufgefangenen Blutes. Von letzterem wurden nun die Blutkörperchen abcentrifugirt. Auf diese Weise wurde ein CaCl₂-Plasma erhalten, welches spontan nicht gerann, wohl aber nach Verdünnung mit Wasser. Eine übrigens wirksame Lösung von Schmidt's Ferment rief im CaCl₂-Plasma keine Gerinnung hervor.

Mittelst Zusatz von verschiedenen Mengen Wasser zum Plasma in Reagensröhrchen, wurde nun die geringste Verdünnung gesucht, bei welcher das Plasma noch gerann. Die Röhrchen wurden ins Wasserbad bei 37⁰ gestellt.

- | | | |
|----|---------------------------------|--|
| a. | 3 ccm. Plasma
1 ccm. Wasser | } Keine Gerinnung. |
| b. | 3 ccm. Plasma
2 ccm. Wasser | } Schwache Gerinnung nach \pm 14 Stunden. |
| c. | 3 ccm. Plasma
3 ccm. Wasser | } Ziemlich gute Gerinnung nach \pm 14 Stunden. |
| d. | 3 ccm. Plasma
6 ccm. Wasser | } Vollständige Gerinnung nach \pm 14 Stunden. |
| e. | 3 ccm. Plasma
9 ccm. Wasser | } Vollständige Gerinnung nach einer Viertelstunde. |
| f. | 3 ccm. Plasma
12 ccm. Wasser | } Vollständige Gerinnung nach einer Viertelstunde. |

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Grenze der Verdünnung, bei welcher das Plasma noch gerinnt, liegt zwischen 1 und 2 ccm. Wasser auf 3 ccm. Plasma, also bei

einem Gehalt von ungefähr 0,75 bis 0,6% CaCl_2 , während bei einem Gehalt von 0,25 bis 0,2% CaCl_2 sehr rasch Gerinnung eintritt.

Auch hier stellt es sich heraus, dass die Gerinnung am raschesten und am besten erfolgt bei demjenigen Gehalt an CaCl_2 , bei welchem das Nucleoproteid aus dem Blutserum aus einer übrigens salzfreien Lösung gefällt wird. Bei einem Gehalt von 0,75% CaCl_2 , bei welchem das mittelst Chlorcalcium gefällte Nucleoproteid nahezu ganz gelöst ist, unterbleibt die Gerinnung.

Man hat bezweifelt, ob das Fibrinferment thatsächlich ein Nucleoproteid ist, und gemeint, dass es vielleicht eine Substanz war, welche dem Nucleoproteid als fortwährende Verunreinigung beigemischt war. Aus den obenstehenden Versuchen geht hervor, dass sowohl das Nucleohiston, als das Nucleoproteid aus Blutserum kleineren und grösseren Mengen CaCl_2 gegenüber sich in einer Weise verhalten, welche sich vollkommen vergleichen lässt mit dem Verhalten des Fibrinferments gegen kleinere oder grössere Mengen CaCl_2 .

Enthalten die Lösungen von Nucleohiston oder von Nucleoproteid keine Calciumsalze, so vermögen sie keine Gerinnung hervorzurufen. Bei einem sehr geringen Gehalt an CaCl_2 werden sie theilweise gefällt und verursachen eine langsame oder unvollständige Gerinnung; bei einem etwas höheren Gehalt an CaCl_2 , nämlich 0,1 bis 0,3%, werden sie am vollständigsten gefällt und es entsteht rasch eine vollkommene Gerinnung. Bei einem Gehalt von 0,5 bis 0,6% CaCl_2 bleibt das Nucleohiston gerade noch gefällt oder es fängt vielleicht schon an, sich zu lösen, während das Nucleoproteid zu einem grossen Theile gelöst ist; die Gerinnung findet nun wiederum langsam statt. Bei einem Gehalt von 0,8% CaCl_2 ist das Nucleoproteid vollständig, das Nucleohiston wenigstens zu einem grossen Theile gelöst und die Gerinnung unterbleibt gänzlich.

Fängt man das Blut in einer Chlorcalciumlösung auf, um durch Verdünnung zu ermitteln, bei welchem Gehalt an CaCl_2 die Gerinnung noch gerade stattfindet, so ist es nöthig, die Versuche mit dem CaCl_2 -Plasma auszuführen. Wird näm-

lich das Blut aufgefangen in einer Chlorcalciumlösung, so dass dasselbe ungefähr 1% CaCl_2 enthält, so bleibt es etwa 12 bis 24 Stunden flüssig, gerinnt aber schliesslich doch. Dieses Verhalten muss wahrscheinlich daraus erklärt werden, das allmählich mehr Nucleoproteid aus den Blutkörperchen sich löst, wodurch die Bildung von Ferment gefördert wird.

Verwendet man zu den Gerinnungsversuchen das nicht von den Blutkörperchen getrennte Blut, so kann nur gezeigt werden, dass die Gerinnung des verdünnten Blutes schneller verläuft, als diejenige des unverdünnten Blutes.

Von Pekelharig wurde gezeigt, dass im spontan nicht gerinnenden verdünnten Magnesiumsulfatplasma nach Zusatz von Fibrinferment, also der Calciumverbindung des Nucleoproteids, Gerinnung eintrat. Er folgerte hieraus, dass im MgSO_4 -Plasma kein Ferment vorhanden sei; wenn das Blut in MgSO_4 -Lösung aufgefangen wurde, so ward nach ihm das freiwerdende Nucleoproteid durch das Magnesiumsulfat verhindert, sich mit Calcium zu verbinden. Diese Ansicht wird noch näher durch die oben erwähnte Beobachtung bestätigt, dass das Nucleoproteid aus dem Blutserum durch MgSO_4 ebenso gut gefällt wird, als durch CaCl_2 , dass also die Magnesiumverbindung ebenso leicht gebildet wird, als die Calciumverbindung.

Man muss sich demnach vorstellen, dass beim Auffangen des Blutes in einer Magnesiumsulfatlösung wegen des grossen Ueberschusses von MgSO_4 , der minimalen Menge Calciumsalz im Blute gegenüber, nur die Magnesiumverbindung des Nucleoproteids gebildet wird, welche Verbindung keine Fermentwirkung besitzt.

Falls diese Ansicht richtig ist, muss auch BaCl_2 die Gerinnung des Blutes verhindern können und muss das BaCl_2 -Plasma auch nach der Verdünnung desselben nicht gerinnen. Es ist dies nun thatsächlich der Fall. Schon vor einigen Jahren sind von Horne¹⁾ Versuche angestellt worden, namentlich über den die Gerinnung hemmenden Einfluss grösserer

1) Journal of Physiology, vol. XIX, p. 356.

Mengen von Calcium-, Baryum- und Strontiumsalzen. Er fand, dass Baryum-, Strontium- und Calciumchlorid die Gerinnung des Blutes hemmten oder verhinderten, falls das Blut einen Gehalt von 0,5% oder grösseren Mengen dieser Salze enthielt. Horne benutzte bei seinen Versuchen das Blut selbst, nicht das daraus zu erhaltene Plasma. Man sieht, dass der von ihm angegebene Gehalt von 0,5% Erdalkalisalz, welcher die Gerinnung hemmt, wenigstens in Bezug auf das Chlorcalcium, sehr gut mit meinen Resultaten übereinstimmt, woraus desgleichen hervorgeht, dass bei einem Gehalt von 0,5% CaCl_2 die Gerinnung stark verzögert wird.

Hinsichtlich der Wirkung des Baryumchlorids habe ich noch folgenden Versuch angestellt:

Ein Liter Blut wurde in 100 ccm. einer gesättigten Baryumchloridlösung aufgefangen. Das Blut gerann nicht. Nachdem die Blutkörperchen abcentrifugirt worden waren, konnte das BaCl_2 -Plasma verdünnt werden, ohne dass Gerinnung auftrat.

Mittelst Zusatz von CaCl_2 zum verdünnten BaCl_2 -Plasma konnte die Gerinnung hervorgerufen werden, ebenso wie dies auch beim verdünnten MgSO_4 -Plasma der Fall ist.

Es stellte sich heraus, dass auch im verdünnten BaCl_2 -Plasma die Gerinnung am raschesten und am vollständigsten vor sich geht, wenn das Gemisch 0,1 bis 0,4% CaCl_2 enthält. Folgende Versuche, wobei die Reagenzröhrchen wiederum in ein Wasserbad von 37° gestellt wurden, werden dies näher erweisen:

- | | | |
|----|-------------------------------|---|
| a. | 3 ccm. Plasma | } Keine Gerinnung. |
| | 12 ccm. Wasser | |
| b. | 3 ccm. Plasma | } Sehr schwache Gerinnung nach
± 18 Stunden. |
| | 12 ccm. Wasser | |
| | 6 Tropfen 1% CaCl_2 | |
| | (1 Tropfen = 0,06 ccm.) | |
| c. | 3 ccm. Plasma | } Ziemlich gute Gerinnung nach
± 18 Stunden. |
| | 12 ccm. Wasser | |
| | 1 Tropfen 10% CaCl_2 | |
| d. | 3 ccm. Plasma | } Vollständige Gerinnung nach
± 20 Minuten. |
| | 12 ccm. Wasser | |
| | 3 Tropfen 10% CaCl_2 | |

e.	3 ccm. Plasma	}	Vollständige Gerinnung nach ± 18 Stunden.
	12 ccm. Wasser		
	10 Tropfen 10% CaCl_2		
f.	3 ccm. Plasma	}	Keine Gerinnung.
	12 ccm. Wasser		
	20 Tropfen 10% CaCl_2		

Dass das verdünnte BaCl_2 -Plasma nach dem Zusatz von CaCl_2 gerinnt, muss wahrscheinlich dem Umstande zugeschrieben werden, dass das Calcium nun nicht mehr dem Baryum gegenüber in so verschwindenden Mengen vorhanden ist. Es wird vielleicht theilweise das Baryum aus seiner Verbindung mit dem Nucleoproteid verdrängen können und damit ist das Ferment gebildet. Selbst die sehr kleinen Mengen Calciumsalz im normalen Blute scheinen eine derartige Wirkung auszuüben. Ich habe wenigstens bemerkt, dass bisweilen auch im verdünnten BaCl_2 -Plasma z. B. nach 24 Stunden ein sehr schwaches Gerinnsel gebildet werden kann. Enthält das verdünnte BaCl_2 -Plasma mehr als 0,5% CaCl_2 , so wird durch diesen Gehalt, ebenso wie beim normalen Blute, die Gerinnung gehemmt.

Hammarsten hat in Bezug auf die Beeinflussung der Gerinnung mittelst CaCl_2 mit den meinigen in Einklang stehende Beobachtungen mitgetheilt.¹⁾ Dieser Forscher führte aber seine Versuche mit reinen Fibrinogenlösungen aus und hat geringere Mengen von Kalksalzen verwendet, so dass die Gerinnung nur verzögert, nicht aber, wie in meinen Versuchen mit Blutplasma, ganz hintangehalten wurde.

1) Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 104.