

# Über quantitative Globulinbestimmungen mittels Ammonsulfatfällung und über die Reindarstellung von Globulinen.

Von  
Privatdozent Dr. **Hugo Wiener.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der deutschen Universität in Prag.)  
(Der Redaktion zugegangen am 26. Juli 1911.)

Die fraktionierte Fällung der Eiweißkörper mit Ammonsulfat, wie sie von Hofmeister eingeführt und von Kauder,<sup>1)</sup> Pohl,<sup>2)</sup> Lewith<sup>3)</sup> und Spiro und Porges<sup>4)</sup> weiter ausgearbeitet wurde, bedeutete einen wesentlichen Fortschritt in der Methodik der Trennung der einzelnen Eiweißkörper und ermöglichte erst eine ganze Reihe von chemischen Untersuchungen an denselben. Wegen ihrer einfachen Durchführbarkeit wurde sie auch vielfach bei experimentellen und klinischen Arbeiten verwendet und so entstanden eine Reihe von Untersuchungen, in denen mit Hilfe dieser Methode das Verhältnis der verschiedenen Eiweißfraktionen im Blutserum und seine Änderungen nach verschiedenen Eingriffen oder bei verschiedenen Krankheiten studiert wurden.

Dies konnte freilich nur unter der stillschweigenden Voraussetzung geschehen, daß diese Methode eine quantitative sei, d. h. daß aus einem Eiweißgemisch, wie es das Blutserum darstellt, durch eine bestimmte Ammonsulfatkonzentration eine bestimmte Eiweißfraktion vollständig ausgefällt wird und eine andere, bei einer anderen Ammonsulfatkonzentration fällbare

<sup>1)</sup> Zur Kenntnis der Eiweißkörper des Blutserums. Arch. f. exp. Path., Bd. 20, S. 411, 1886.

<sup>2)</sup> Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten. Arch. f. exp. Path., Bd. 20, S. 426, 1886.

<sup>3)</sup> Zur Lehre von der Wirkung der Salze. I. Mitteil. Arch. f. exp. Path., Bd. 24, S. 1, 1888.

<sup>4)</sup> Globuline des Blutserums. Hofmeisters Beitr., Bd. 3, S. 277, 1902.

nicht mitgefällt wird. Und doch hatte sich außer Pohl<sup>1)</sup> keiner der Autoren mit der quantitativen Seite dieser Frage beschäftigt. Pohl war der einzige, der sich die Frage vorlegte, ob bei Halbsättigung mit Ammonsulfat wirklich nur das Globulin und ob dieses vollständig ausgefällt wird. Freilich machte er seine Untersuchungen nicht an Blutserum, sondern an Eiweißharnen und serösen Flüssigkeiten und es lassen sich daher seine Resultate nicht ohne weiteres auf Blutserum übertragen. Daß das Globulin bei Halbsättigung mit Ammonsulfat vollständig ausgefällt wird, erschloß Pohl, wie dies schon Kauder getan hatte, aus dem Umstande, daß nach der Globulinausfällung ein ziemlich großes Spatium vorhanden ist, bis man bei stetig zunehmender Ammonsulfatkonzentration wieder eine Trübung erhält, die bereits als Albuminfällung angesehen werden muß.

Aber auch in der anderen Richtung entschied sich Pohl für die Brauchbarkeit der Methode in quantitativer Hinsicht, indem er auch den Nachweis erbracht zu haben glaubte, daß die durch Halbsättigung mit Ammonsulfat erzeugte Fällung nur aus Globulin bestehe. Auf Grund zweier Tatsachen gelangte er zu dieser Anschauung. Erstens fand er eine sehr weitgehende Übereinstimmung der mit dieser neuen Methode gefundenen Werte mit den nach der alten Methode von Hammarsten durch Sättigung mit Magnesiumsulfat erhaltenen. Zweitens zeigte der bei Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällte Eiweißkörper die damals für das Globulin als charakteristischste angesehene Eigenschaft, nämlich Fällbarkeit durch Dialyse.

Freilich wurde zunächst nur ein kleiner Teil durch Dialyse gefällt. Durch Abfiltrieren des gelöst gebliebenen Anteiles, abermalige Fällung mit Ammonsulfat und nochmalige Dialysierung wurde abermals ein Teil des Eiweißes zur Ausfällung gebracht und durch mehrfache Wiederholung dieser Prozeduren wurde es dahin gebracht, daß schließlich die in der letzten Portion noch enthaltene Eiweißmenge fast ganz durch Dialyse ausgefällt wurde, die zurückbleibende Flüssigkeit eiweißfrei war, so daß Pohl den Schluß zieht, daß die ganze, durch Halb-

sättigung mit Ammonsulfat ausgefällte Eiweißmenge Globulin sei. Trotzdem besteht aber die Möglichkeit, daß bei diesem Ammonsulfatzusatze auch noch andere Eiweißfraktionen mitgerissen wurden, ja daß vielleicht letztere gerade es waren, welche das Ausfällen des gesamten Globulins durch Dialyse verhinderten, daß sie bei dem wiederholten Umfällen des in Lösung gebliebenen Globulinanteiles allmählich immer mehr entfernt wurden, bis schließlich nur das reine Globulin zurückblieb, das dann bei der Dialyse vollständig ungehindert ausfallen konnte. Für eine solche Möglichkeit sprechen meine gleich mitzuteilenden Versuche, die freilich lediglich mit Blutserum und nicht mit Eiweißharnen angestellt wurden.

Wie dem aber auch sei, daß die fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat, wie man sie allgemein ausführt, für das Blutserum keine quantitativen Resultate gibt, davon kann man sich leicht schon durch orientierende Versuche überzeugen.

Verwendet man zu solchen Versuchen ein Blutserum, das aus irgendeinem Grunde gelösten Blutfarbstoff enthält, so konstatiert man, daß jeder durch Zusatz von Ammonsulfat — auch durch den geringsten, bei dem überhaupt ein Niederschlag entsteht — erzeugte Eiweißniederschlag von mitgefälltem Blutfarbstoff intensiv braunrot gefärbt ist, obzwar der Blutfarbstoff isoliert erst bei sehr hohen Ammonsulfatkonzentrationen ausfallen sollte. Filtriert man einen solchen Niederschlag ab, löst ihn in einer beiläufig dem ursprünglichen Serumvolumen gleichen Menge Wasser und stellt in dieser Lösung die gleiche Ammonsulfatkonzentration, bei der der Niederschlag aus dem Serum erhalten wurde, wieder her, so entsteht abermals ein Niederschlag, der sich in der Intensität der Färbung kaum von dem ersten unterscheidet. Trotzdem ist aber ein Teil des früher mitgefällt gewesenen Blutfarbstoffs in Lösung gegangen, was man aus der roten Farbe der über dem Niederschlag stehenden klaren Flüssigkeit erschließen muß. Wiederholt man diese Prozedur etliche Male, so bleibt immer wieder ein Teil des Blutfarbstoffs in Lösung, aber der immer wieder erzeugte Niederschlag hält doch soviel Blutfarbstoff fest, daß eine Abnahme seiner Färbung kaum wahrzunehmen ist.

Ganz die gleichen Resultate erhält man, wenn man einen bei einer bestimmten Ammonsulfatkonzentration erzeugten Niederschlag aufs Filter bringt und ihn mit einer Ammonsulfatlösung gleicher Konzentration auswäscht. Ein Teil des mitgefällten Blutfarbstoffes geht zunächst in Lösung, die abfließende Flüssigkeit ist erst intensiv rot gefärbt, die Farbe derselben hellt sich aber rasch auf, schließlich fließt die Flüssigkeit farblos ab, der Niederschlag ist aber dennoch intensiv gefärbt geblieben.

Verdünt man aber ein solches hämoglobinhaltiges Serum von vornherein sehr stark und stellt dann in ihm die gleiche Ammonsulfatkonzentration, wie in den früheren Versuchen her, so fällt ein weißer Niederschlag aus, der auf dem Filter, ohne gewaschen zu werden, sich in schneeweißter Farbe präsentiert.

Es geht daher aus diesen Versuchen hervor, daß im Serum schon bei einer relativ geringen Ammonsulfatkonzentration außer dem Eiweißkörper, der bei der betreffenden Ammonsulfatkonzentration ausgefällt wird, auch noch ein anderer Eiweißkörper, der erst bei einer viel höheren Ammonsulfatkonzentration ausfallen sollte, der Blutfarbstoff, mitgefällt wird, daß ein Teil des letzteren zwar nachträglich durch Waschen mit der gleichkonzentrierten Ammonsulfatlösung wieder entfernt werden kann, ein Teil aber hartnäckig dem Niederschlag anhaftet und auf diese Weise nicht mehr von demselben getrennt werden kann. Daß man auch durch mehrmaliges Umfällen den Niederschlag von einem Teile des mitgefällten Blutfarbstoffes befreien kann, daß aber die vollständige Befreiung des Niederschlages von dem Blutfarbstoffe höchstens nach zahllosen Umfällungen möglich ist, wozu ich es freilich nie gebracht habe, wofür aber der Umstand spricht, daß nach mehrmaliger Umfällung immer noch beträchtliche Mengen Blutfarbstoffs in Lösung blieben. Daß man schließlich durch (außerordentlich) starke Verdünnung des Serums das Mitfällen von Blutfarbstoff verhüten kann.

Es war nun von vornherein zu erwarten, daß das, was diese orientierenden Versuche für einen Eiweißkörper, den Blutfarbstoff, dessen Anwesenheit schon mit dem Auge erschlossen werden konnte, erwiesen, auch für andere Eiweißkörper Gültigkeit haben dürfte. Es war also die Frage zu erwägen, ob

tatsächlich die fraktionierten Salzfällungen quantitativ erfolgen, da Täuschungen infolge des Mitreißens anderer Eiweißkörper die Resultate entstellen können. Gleichzeitig war durch diese Versuche der Weg vorgezeichnet, den man einzuschlagen habe, um diese Frage zu entscheiden.

Es wurden dementsprechend gleiche Mengen eines Serums oder vielmehr, wie ich es fast ausschließlich machte, da es zur Lösung dieser Frage hinreichend erschien, nur eine bestimmte Eiweißfraktion zu studieren, gleiche Mengen eines Filtrates genommen, das ich nach Ausfällung eines Serums bei einer bestimmten Ammonsulfatkonzentration erhalten hatte. Diese Proben wurden in verschiedenem Maße verdünnt und dann in allen eine gleiche, höhere Ammonsulfatkonzentration hergestellt. Die Verdünnung geschah nicht mit Wasser, sondern mit einer Ammonsulfatlösung, deren Konzentration jener entsprach, die schließlich in der Gesamtlösung hergestellt werden sollte. (Der Nachweis anderer, mitgefällter Eiweißfraktionen konnte natürlich nur mit der Wage geführt werden.)

Da ich zunächst den Einfluß des Auswaschens des auf das Filter gebrachten Niederschlags nicht kannte, so unterließ ich das Freiwaschen von dem das Filter und den Niederschlag durchtränkenden gelöst gebliebenen Eiweiß, bestimmte die Menge des letzteren auf einem anderen Wege und brachte es von dem durch Wägung bestimmten Werte in Abzug.

Das nähere Vorgehen war folgendes: Der in einer Probe erzeugte Niederschlag wurde mehrere Stunden stehen gelassen, dann auf ein gewogenes Filter gebracht, der Rest des im Becherglase gebliebenen Niederschlages durch mehrmaliges Nachwaschen mit dem Filtrat ebenfalls quantitativ aufs Filter gebracht. Da die Filtration ziemlich langsam vor sich ging und es daher längerer Zeit bedurfte, bis der ganze Niederschlag im Filter war, wurde, um eine Verdunstung und dadurch eine Konzentrationsvermehrung der Ammonsulfatlösung zu verhüten, die ganze Filtration in einer feuchten Kammer vorgenommen, die ich mir in der Weise herstellte, daß ich das Kölbchen mit dem Trichter in eine Porzellanschale mit flachem Boden stellte, in dieselbe eine geringe Menge einer Ammonsulfatlösung gleicher

Konzentration goß und über das Ganze eine Glasglocke stülpte, deren Rand in die Flüssigkeit eintauchte.

Nach Beendigung der Filtration wurde das Filter leicht abgepreßt und zunächst feucht gewogen, dann bei ca.  $110^{\circ}$  C. zur Gewichtskonstanz getrocknet und abermals gewogen, schließlich mit heißem Wasser ammoniumsulfatfrei gewaschen, abermals bei  $105-110^{\circ}$  C. zur Gewichtskonstanz getrocknet und nochmals gewogen. Die Differenz zwischen dem Werte (1) bei der ersten und dem Werte (2) bei der zweiten Wägung bedeutete den Wasserverlust, die Differenz zwischen dem Werte (2) bei der zweiten und dem Werte (3) bei der dritten Wägung den Ammonsulfatverlust, die Differenz zwischen dem Werte (3) der dritten Wägung und dem Gewichte des leeren Filters (4) die Menge des gefällten Eiweißes vermehrt um die Menge des das Filter und den Niederschlag durchtränkenden gelöst gebliebenen Eiweißes.

Um nun in bequemer Weise zunächst das feuchte, dann das trockene Filter wägen und dann das trockene Filter sulfatfrei waschen und nach abermaliger Trocknung wägen zu können, hat sich folgender Vorgang bewährt. Ein getrocknetes Papierfilter wurde in ein getrocknetes, mit Glaswolle adjustiertes Ludwigsches Filter, wie man es zur Harnsäurefiltration benutzt, gesteckt, das Ganze gewogen, dann das Filter herausgenommen, auf demselben der Niederschlag gesammelt, nach Abpressen das Filter wieder in das Ludwigsche Apparatchen gebracht, das Ganze abermals gewogen, dann getrocknet und wieder gewogen, schließlich in dem Ludwigschen Filter die Sulfatfreiwaschung vorgenommen und das Ganze wieder getrocknet und gewogen.

Es handelte sich dann nur noch darum, die Menge des mitgewogenen gelöst gebliebenen Eiweißes zu bestimmen, um dieselbe von der gewogenen Gesamtmenge des Eiweißes abzuziehen und so die Menge des gefällten Eiweißes berechnen zu können.

Zu diesem Behufe wurde eine abgemessene Menge des Filtrates in einem Wägegläschen gewogen, dann zur Gewichtskonstanz bei ca.  $110^{\circ}$  C. getrocknet und abermals gewogen.

Die Differenz zwischen dem bei der ersten Wägung erhaltenen Werte (1) und dem bei der zweiten Wägung erhaltenen Werte (2) ergab den Wassergehalt des Filtrates. Die Differenz zwischen dem Werte 2 und dem Gewichte des leeren Wäagegläschens (3) ergab den Trockenrückstand, die Summe beider Differenzen das Gewicht des entsprechenden Volumens des Filtrates.

Aus den früheren Wägungen war der Wassergehalt des Filters + Niederschlages bekannt, aus den letzten der Wassergehalt des Filtrates, es konnte daher durch eine einfache Proportion berechnet werden, wieviel von der Eiweißlösung, dem Filtrate den Niederschlag und das Filter durchtränkt hatte. Um dann die aus dieser Eiweißlösung stammende, mitgewogene Eiweißmenge zu bestimmen, bedurfte es nur noch der Ermittlung des Eiweißgehaltes des Filtrates. Dies geschah in der Weise, daß eine abgemessene Menge des Filtrates mit saurem phosphorsaurem Natron versetzt, aufgeköcht und durch ein gewogenes Filter filtriert wurde. Das Filter wurde dann ammoniumsulfatfrei gewaschen, getrocknet und gewogen. Der Gewichtszuwachs bedeutete die in dieser Menge enthaltene Eiweißmenge. Darnach konnte die aus dem Filtrate stammende mitgewogene Eiweißmenge berechnet und von der gewogenen Gesamtmenge abgezogen werden. Auf diese Weise resultierte dann die Gesamtmenge des Eiweißniederschlages.

Alle Proben wurden zur Kontrolle doppelt ausgeführt. Die Versuche wurden in einem gut temperierten Raume vorgenommen, dessen Temperatur keine nennenswerten Schwankungen um 20° C. auch während der Nachtzeit aufwies.

Ich will nun einige solcher Versuche anführen.

#### Versuch I.

240 ccm Pferdeserum werden versetzt mit 60 ccm einer halbgesättigten und 60 ccm einer gesättigten Ammonsulfatlösung, so daß die ganze Flüssigkeit eine  $\frac{1}{4}$  gesättigte Ammonsulfatlösung darstellt.

Nach mehreren Stunden wird von dem entstandenen Niederschlag abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.

1. 20 ccm Filtrat werden bei Zimmertemperatur (ca. 20° C.) versetzt mit 10 ccm einer gesättigten Ammonsulfatlösung, so daß eine Halb-sättigung mit Ammonsulfat erzielt wird. Der entstandene Niederschlag

wird in der früher beschriebenen Weise bestimmt. Die Bedeutung der Zahlen ist aus Seite 34 zu ersehen.

a) 1. 19,7244	3,1062	b) 1. 19,6314	2,6314
2. 16,6182	1,0214	2. 17,0000	0,8538
3. 15,5968	0,5390	3. 16,1462	0,5334
4. 15,0578		4. 15,6128	

a) 0,5390 g, b) 0,5334 g Eiweiß gewogen.

10 ccm des Filtrats wiegen:

1. 19,7934	8,4254	} 11,4434.
2. 11,3680	3,0180	
3. 8,3500		

In 10 ccm Filtrat wird, wie oben beschrieben, der Eiweißgehalt bestimmt. Es ergibt sich:

a) 37,7228	0,1248	b) 32,2076	0,1250.
37,5980		32,0826	

Die Menge des mit dem Niederschlag mitgewogenen, gelöst gewesenen Eiweißes beträgt demnach:

$$a) \frac{0,1248 \times 3,1062}{8,4254} = 0,0460 \text{ g.} \quad b) \frac{0,1250 \times 2,6314}{8,4254} = 0,0390 \text{ g.}$$

Diese Werte sind von dem gefundenen Gesamtgewicht des Eiweißes abzuziehen. Es beträgt daher das Gewicht des Eiweißniederschlags:

$$a) 0,5390 - 0,0460 = 0,4930 \text{ g.} \quad b) 0,5334 - 0,0390 = 0,4944 \text{ g.}$$

im Mittel **0,4937 g.**

2. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 20 ccm einer halbgesättigten und 10 ccm einer gesättigten Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird wieder wie bei 1 bestimmt.

a) 1. 20,6680	3,1836	b) 1. 19,1646	2,6970
2. 17,4844	1,0134	2. 16,4676	0,8562
3. 16,4710	0,4538	3. 15,6114	0,4524
4. 16,0172		4. 15,1590	

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 19,5962	8,5298	} 11,3844.
2. 11,0664	2,8546	
3. 8,2118		

In 10 ccm Filtrat wird der Eiweißgehalt bestimmt.

a) 13,8400	0,0822	b) 35,8342	0,0828.
13,7578		35,7514	

Von dem gewogenen Eiweiß ist daher in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,0822 \times 3,1836}{8,5298} = 0,0283 \text{ g.} \quad b) \frac{0,0828 \times 2,6970}{8,5298} = 0,0261 \text{ g.}$$

Daher beträgt das Gewicht des Niederschlags:

$$a) 0,4538 - 0,0283 = 0,4255 \text{ g.} \quad b) 0,4524 - 0,0261 = 0,4263 \text{ g.}$$

im Mittel **0,4259 g.**



3. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 80 ccm einer halbgesättigten und 10 ccm einer gesättigten Ammonsulfatlösung, so daß die Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird wieder wie oben bestimmt.

a) 1. 17,7408	2,2610	b) 1. 20,3580	2,4740
2. 15,4798	0,7072	2. 17,8840	0,7730
3. 14,7726	0,4138	3. 17,1110	0,4208
4. 14,3588		4. 16,6902	

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 20,7288	8,6176	} 11,4172.
2. 12,1112	2,7996	
3. 9,3116		

In 10 ccm Filtrat wird der Eiweißgehalt bestimmt.

a) 32,3910	0,0314	b) 44,1748	0,0318.
32,3596		44,1430	

Von dem gewogenen Eiweiß ist daher in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,0314 \times 2,2610}{8,6176} = 0,0082 \text{ g.} \quad b) \frac{0,0318 \times 2,4740}{8,6176} = 0,0091 \text{ g.}$$

Daher beträgt das Gewicht des Niederschlages:

$$a) 0,4138 - 0,0082 = 0,4056 \text{ g,} \quad b) 0,4208 - 0,0091 = 0,4117 \text{ g,}$$

im Mittel **0,4087 g.**

4. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 480 ccm halbgesättigter und 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird wieder wie oben bestimmt.

a) 1. 20,6964	3,1162	b) 1. 19,1408	2,9246
2. 17,5802	1,0210	2. 16,2162	1,0178
3. 16,5592	0,4072	3. 15,1984	0,4100
4. 16,1520		4. 14,7884	

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 19,6106	8,6336	} 11,3986.
2. 10,9770	2,7650	
3. 8,2120		

In 10 ccm Filtrat wird der Eiweißgehalt bestimmt.

a) 22,4114	0,0016	b) 26,1432	0,0016.
22,4098		26,1416	

Von dem gewogenen Eiweiß ist daher in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,0016 \times 3,1162}{8,6336} = 0,0006 \text{ g,} \quad b) \frac{0,0016 \times 2,9246}{8,6336} = 0,0005 \text{ g.}$$

Daher beträgt das Gewicht des Niederschlages:

$$a) 0,4072 - 0,0006 = 0,4066 \text{ g,} \quad b) 0,4100 - 0,0005 = 0,4095 \text{ g,}$$

im Mittel **0,4080 g.**

In 20 ccm des Filtrats eines bei  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat ausgefällten Serums wurden daher von der zwischen  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ -Sättigung ausfällbaren Eiweißfraktion gefunden 0,4937 g, bei Verdünnung auf das Doppelte 0,4259 g, bei Verdünnung auf das Fünffache 0,4087 g und bei Verdünnung auf das Fünfundzwanzigfache 0,4080 g.

Es wurden demnach in dem auf das Fünfundzwanzigfache verdünnten Filtrate nur 82,64% des Wertes im unverdünnten Filtrate gefunden.

### Versuch II.

300 ccm Pferdeserum werden versetzt mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die ganze Flüssigkeit eine  $\frac{1}{4}$  gesättigte Ammonsulfatlösung darstellt. Nach mehreren Stunden wird von dem entstandenen Niederschlage abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.

1. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß eine Halbsättigung mit Ammonsulfat resultiert. Der entstandene Niederschlag wird in der bekannten Weise bestimmt.

a) 1. 20,1928	3,8330	b) 1. 22,2130	3,5633
2. 16,3598	1,2780	2. 18,6497	1,1713
3. 15,0818	0,6822	3. 17,4784	0,6740
4. 14,3996		4. 16,8044	

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 27,9826	} 11,5452.
2. 19,4734	
3. 16,4374	

In 10 ccm Filtrat wird der Eiweißgehalt bestimmt.

a) 22,6408	0,1794	b) 32,5866	0,1752.
22,4614		32,4114	

Von dem gewogenen Eiweiß ist daher in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,1794 \times 3,8330}{8,5092} = 0,0808 \text{ g.} \quad b) \frac{0,1752 \times 3,5633}{8,5092} = 0,0733 \text{ g.}$$

Daher beträgt das Gewicht des Niederschlages:

$$a) 0,6822 - 0,0808 = 0,6014 \text{ g.} \quad b) 0,6740 - 0,0733 = 0,6007 \text{ g.}$$

im Mittel **0,6010 g.**

2. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 20 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder eine Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird in der bekannten Weise bestimmt.

a) 1. 19,9420	3,3302	b) 1. 21,5664	3,5382
2. 16,6118	1,0418	2. 18,0282	1,1030
3. 15,5700	0,5822	3. 16,9252	0,5832
4. 14,9878		4. 16,3420	

10 ccm Filtrat wiegen:

1.	28,8190	} 11,4094.
2.	20,2660	
3.	17,4096	

In 10 ccm Filtrat wird der Eiweißgehalt bestimmt.

a)	37,7730	0,1166	b)	32,2518	0,1156.
	37,6564			32,1362	

Von dem gewogenen Eiweiß ist daher in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,1166 \times 3,3302}{8,5530} = 0,0478 \text{ g, } b) \frac{0,1156 \times 3,5382}{8,5530} = 0,0478 \text{ g.}$$

Daher beträgt das Gewicht des Niederschlages:

$$a) 0,5822 - 0,0478 = 0,5344 \text{ g, } b) 0,5832 - 0,0478 = 0,5354 \text{ g.}$$

im Mittel **0,5349 g.**

3. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 60 ccm halbgesättigter und 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird in der bekannten Weise bestimmt.

a)	1.	21,5488	} 11,4408.
	2.	18,0668	
	3.	16,9662	
	4.	16,4366	

b)	1.	20,6308	3,7312
	2.	16,8996	1,1490
	3.	15,7506	0,5220
	4.	15,2286	

10 ccm des Filtrats wiegen:

1.	31,7478	} 11,4408.
2.	23,1500	
3.	20,3070	

In 10 ccm Filtrat wird der Eiweißgehalt bestimmt:

a)	35,8732	0,0674	b)	44,2622	0,0682.
	35,8058			44,1940	

Von dem gewogenen Eiweiß ist daher in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,0674 \times 3,4820}{8,5978} = 0,0272 \text{ g, } b) \frac{0,0682 \times 3,7312}{8,5978} = 0,0293 \text{ g.}$$

Daher beträgt das Gewicht des Niederschlages:

$$a) 0,5078 - 0,0128 = 0,4950 \text{ g, } b) 0,5062 - 0,0129 = 0,4933 \text{ g,}$$

im Mittel **0,4941 g.**

5. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 300 ccm halbgesättigter und 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird in der bekannten Weise bestimmt.

a)	1.	21,3198	} 11,4408.
	2.	17,6234	
	3.	16,4922	
	4.	15,9960	

b)	1.	21,1852	4,0752
	2.	17,1100	1,2898
	3.	15,8202	0,4970
	4.	15,3232	

10 ccm Filtrat wiegen:

1.	29,2284	} 11,4214.
2.	20,5756	
3.	17,8070	

In 10 ccm Filtrat wird der Eiweißgehalt bestimmt:

a)	23,7016	0,0178	b)	13,8342	0,0178.
	23,6838			13,8164	

Von dem gewogenen Eiweiß ist daher in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,0178 \times 3,6964}{8,6528} = 0,0076 \text{ g, } b) \frac{0,0178 \times 4,0752}{8,6528} = 0,0080 \text{ g.}$$

Daher beträgt das Gewicht des Niederschlages:

$$a) 0,4962 - 0,0076 = 0,4886 \text{ g, } b) 0,4970 - 0,0080 = 0,4890 \text{ g.}$$

im Mittel **0,4888 g.**

In 20 ccm des Filtrates eines bei  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat ausgefällten Serums wurden daher von der zwischen  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ -Sättigung ausfällbaren Eiweißfraktion gefunden 0,6010 g, bei Verdünnung auf das Doppelte 0,5349 g, bei Verdünnung auf das Vierfache 0,4975 g, bei Verdünnung auf das Achtfache 0,4941 g, bei Verdünnung auf das Sechzehnfache 0,4888 g.

Es wurden daher in dem auf das Sechzehnfache verdünnten Filtrate nur 81,32% des Wertes im unverdünnten Filtrate gefunden.

Beide angeführten Versuche, sowie noch eine Reihe anderer, die zum Teile noch in anderer Absicht ausgeführt wurden und die ich deshalb erst später hier wiedergeben werde, fielen gleichsinnig aus. Stets ergab sich, daß man bei Ausfällung einer bestimmten Eiweißfraktion aus unverdünntem Serum höhere Werte erhielt, als bei Ausfällung derselben Eiweißfraktion aus verdünntem Serum, eine Beobachtung, die schon von Wallerstein<sup>1)</sup> gemacht wurde. Es erhebt sich nun die Frage, welcher Wert der richtige ist, ob man bei Fällung im unverdünnten Serum den richtigen und bei Fällung im verdünnten einen zu geringen Wert erhält oder ob man bei Fällung im verdünnten den richtigen und bei Fällung im unverdünnten einen zu hohen Wert erhält. Mit anderen Worten, ob im unverdünnten Serum die betreffende Eiweißfraktion fast vollständig ausfällt, dieser

<sup>1)</sup> Quantitative Bestimmung der Globuline im Blutserum usw. Inaug.-Diss.. Straßburg 1902.

Niederschlag aber in der Ammonsulfatlösung von der betreffenden Konzentration nicht absolut unlöslich ist, so daß bei Verdünnung des Serums infolge des größeren Volumens der betreffenden Ammonsulfatlösung ein viel größerer Teil in Lösung bleibt oder ob der im verdünnten Serum erzeugte Niederschlag in der Ammonsulfatlösung von der betreffenden Konzentration unlöslich ist, dafür aber bei der Ausfällung aus unverdünntem Serum noch andere, höhere Eiweißfraktionen mit ausgefällt werden. Für letztere Auffassung sprach außer dem Ausfall der orientierenden Versuche an einem hämoglobinhaltigen Serum noch die Tatsache, daß trotz sprunghafter Zunahme der Verdünnungen der Sera die Abnahme in dem Gewichte der Niederschläge immer geringer wird, so daß über eine gewisse, hohe Verdünnung hinaus trotz weiterer beträchtlicher Zunahme der Verdünnung die Niederschläge sich einem konstanten Werte nähern.

Zur Sicherung dieser Anschauung mußten aber direkte Beweise erbracht werden, daß tatsächlich der in verdünntem Serum erzeugte Niederschlag in der Ammonsulfatlösung von der betreffenden Konzentration unlöslich ist, während von dem im unverdünnten Serum erzeugten Niederschlage immer wieder ein Teil in Lösung geht.

Zu diesem Zwecke habe ich eine Reihe von Versuchen gemacht, von denen ich einige hier anführen will.

### Versuch III.

300 ccm Pferdeserum werden versetzt mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß in der Lösung  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat erzielt wird. Nach mehreren Stunden wird von dem entstandenen Niederschlage abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.

200 ccm Filtrat werden versetzt mit 1400 ccm halbgemättigter und 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbgemättigung mit Ammonsulfat aufweist. Nach mehreren Stunden wird wieder vom entstandenen Niederschlag abfiltriert und zunächst der Eiweißgehalt des Filtrates in der früher beschriebenen Weise bestimmt.

In 20 ccm Filtrat ist Eiweiß enthalten.

$$\begin{array}{rcl} \text{a) } 35,9284 & & \text{b) } 37,7034 \\ & \cdot 0,0746 & & \cdot 0,0732 \\ \hline & 35,8538 & & 37,6302 \end{array}$$

Der Niederschlag wird scharf abgepreßt, in 200 ccm  $\frac{1}{4}$ -gemättigter Ammonsulfatlösung gelöst und der Lösung wieder 1400 ccm  $\frac{1}{4}$ -gemättigter

und 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung zugefügt, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Nun wird der frühere Vorgang wiederholt. Von dem entstandenen Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert und der Eiweißgehalt des Filtrates bestimmt.

In 100 ccm Filtrat ist Eiweiß enthalten.

a) 32,3738	0,0190	b) 35,8080	0,0190.
32,3548		35,7890	

Der Niederschlag wird abermals scharf abgepreßt, in 200 ccm  $\frac{1}{4}$ -gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst, die Lösung versetzt mit 1400 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Von dem entstandenen Niederschlag wird abermals nach mehreren Stunden abfiltriert und der Eiweißgehalt des Filtrates untersucht.

Es ergibt sich in 200 ccm Filtrat.

a) 32,0860	0,0080	b) 44,2000	0,0090.
32,0780		44,1910	

im Mittel 0,0085 g.

Die Ausrechnung dieses Versuches ergibt: Die 200 ccm des ursprünglich nach Ausfällung des Serums bei  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat verwendeten Filtrates entsprechen 150 ccm des Serums. Wenn man diese auf ein Volumen von 1700 ccm verdünnt, so bleiben in diesem Volumen nach Ausfällung bei Halbsättigung mit Ammonsulfat 6,324 g, nach einmaliger Umfällung 0,323 g, nach nochmaliger Umfällung 0,0722 g Eiweiß in Lösung.

Der hohe Wert für das gelöste Eiweiß nach der ersten Fällung muß zum größten Teile, wenn nicht ausschließlich, auf die erst bei höheren Ammonsulfatkonzentrationen ausfallenden Eiweißfraktionen, also auf das Albumin des Serums bezogen werden. Der Wert nach der ersten Umfällung könnte zum Teile auf die den Niederschlag trotz der scharfen Abpressung noch durchfeuchtende Lösung der höheren Eiweißfraktionen bezogen werden, zum Teile könnte er aber davon herrühren, daß ein Teil des gefällt gewesenen Eiweißes jetzt wieder in Lösung ging. Daß letzteres eingetreten sein mußte, ergibt eine Ausrechnung, da unmöglich soviel Flüssigkeit in dem abgepreßten Niederschlag enthalten sein konnte, daß von ihr der ganze Eiweißgehalt des Filtrates herrühren könnte. Ebenso läßt der Eiweißgehalt des Filtrates nach der zweiten Umfällung

darauf schließen, daß ein Teil des Niederschlages abermals in Lösung gegangen ist.

Wenn auch demnach dieser Versuch ergab, daß der in stark verdünntem Serum durch eine Ammonsulfatlösung von bestimmter Konzentration erzeugte Niederschlag in der so konzentrierten Ammonsulfatlösung nicht absolut unlöslich ist, so war doch die Möglichkeit vorhanden, daß die Schuld an diesem Resultate doch eine zu geringe Verdünnung des Serums trage. Tatsächlich ist auch die Verdünnung nur auf das Achtefache getrieben worden und die beiden ersten Versuche hatten ja gezeigt, daß bei dieser Verdünnung, wenn die zweite der oben ausgeführten Anschauungen richtig ist, Eiweißfraktionen, die erst bei höheren Ammonsulfatkonzentrationen ausfallen sollten, noch immer zum Teile mitgefällt werden.

Es mußten daher zur Entscheidung der Frage die gleichen Versuche, aber bei höheren Verdünnungen gemacht werden.

#### Versuch IV.

180 ccm Pferdeserum werden versetzt mit 60 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat erzielt wird. Von dem entstandenen Niederschlage wird nach mehreren Stunden abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.

a) 100 ccm Filtrat werden versetzt mit 100 ccm  $\frac{1}{4}$ -gesättigter, 1500 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Von dem entstandenen Niederschlage wird nach mehreren Stunden abfiltriert und der Eiweißgehalt des Filtrates bestimmt. Derselbe ergibt in 20 ccm Filtrat:

$$\begin{array}{r} 44.3650 \\ 44.3500 \end{array} \quad 0,0150 \text{ g.}$$

Der Niederschlag wird scharf abgepreßt, in 200 ccm  $\frac{1}{4}$ -gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst, die Lösung mit 1500 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Von dem entstandenen Niederschlage wird wieder nach mehreren Stunden abfiltriert und im Filtrat der Eiweißgehalt bestimmt. Es ergibt sich, daß das Filtrat nach Ansäuern und Aufkochen nur eine ganz schwache Opalescenz, aber keinen Niederschlag zeigt und daß selbst in 200 ccm Filtrat keine wägbaren Eiweißmengen enthalten sind. Eine nochmalige Lösung des abgepreßten Niederschlages und nochmalige Fällung unter den gleichen Bedingungen wie früher ergibt, daß das Filtrat vollständig eiweißfrei ist.

b) 100 ccm desselben wie bei a) verwendeten Filtrates werden in

derselben Weise verarbeitet wie bei a). Nach der ersten Fällung enthalten 20 ccm des Filtrates fast dieselbe Eiweißmenge wie in Versuch a, nämlich 0,0154 g. Der bei der Fällung entstandene Niederschlag wird abgepreßt, da aber dabei das Filter an einigen Stellen zerriß, konnte die Abpressung nicht so vollständig durchgeführt werden, wie im Versuche a.

Nun wird dieser Niederschlag wieder in 200 ccm  $\frac{1}{4}$ -gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst, die Lösung mit 1500 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Von dem entstandenen Niederschlage wird nach mehreren Stunden abfiltriert und der Eiweißgehalt im Filtrate bestimmt. Es ergibt sich:

32,3398  
32,3238 0,0160 g.

Der Niederschlag wird diesmal scharf abgepreßt, in 200 ccm  $\frac{1}{4}$ -gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst, mit 1500 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Von dem entstandenen Niederschlage wird wieder nach mehreren Stunden abfiltriert und der Eiweißgehalt des Filtrates bestimmt. Es ergibt sich wieder nach Ansäuern und Aufkochen eine schwache Opalescenz und in 200 ccm Filtrat nicht wägbare Eiweißmengen.

Nach nochmaliger Wiederholung derselben Prozeduren ist das Filtrat vollständig eiweißfrei.

Dieser Versuch, in dem die Verdünnung auf das Siebzehnfache getrieben wurde, ergibt ein anderes Resultat, als der vorige. Hier zeigt sich, daß tatsächlich der bei Halbsättigung von Ammonsulfat erzeugte Niederschlag in einer halbgesättigten Ammonsulfatlösung unlöslich ist und daß daher das abweichende Resultat des vorigen Versuches nur durch die dort verwendete, zu geringe Verdünnung erzeugt war.

Das Filtrat nach der ersten Fällung enthielt hier noch beträchtliche Eiweißmengen, die ja selbstverständlich von den bei höheren Ammonsulfatkonzentrationen erst ausfallenden Eiweißfraktionen herrühren mußten. Daß sie nur von diesen herrührten, beweist erstens der Umstand, daß bei scharfer Abpressung des Niederschlages, wie es bei a) erfolgte, kaum Spuren von Eiweiß dann in Lösung gingen, zweitens aber, daß, wenn wie bei b) die Abpressung keine genügende war, doch noch dann wägbare Eiweißmengen in Lösung gingen. Nach den weiteren Abpressungen ging aber kein Eiweiß mehr in Lösung. Der Niederschlag als solcher war daher in der betreffenden Ammonsulfat-



lösung unlöslich und die in den ersten Filtraten nachgewiesenen Eiweißmengen rührten nur von der den Niederschlag durchtränkenden Eiweißlösung her.

Wenn dem so ist, dann war zu erwarten, daß, falls ein solcher Niederschlag auf andere Weise, als durch Abpressen, von der ihn durchtränkenden Eiweißlösung befreit würde, nach Lösen des Niederschlages und Wiederfällen gleich beim ersten Male überhaupt kein Eiweiß im Filtrate nachzuweisen ist.

Folgender Versuch zeigt dieses erwartete Verhalten.

#### Versuch V.

150 ccm Pferdeserum werden versetzt mit 50 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat erzielt wird. Von dem erhaltenen Niederschlage wird nach mehreren Stunden abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.

100 ccm Filtrat werden versetzt mit 100 ccm  $\frac{1}{4}$ -gesättigter, 1500 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Von dem entstandenen Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert und der Niederschlag auf dem Filter mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, bis die abfließende Flüssigkeit eiweißfrei ist.

Ich möchte hier erwähnen, daß sich zur Untersuchung, ob die abfließende Flüssigkeit Eiweiß enthält, die Ferrocyanwasserstoffprobe nicht eignet, obzwar vielfach gerade diese Probe zur Prüfung, ob auf die gewöhnliche Methode gefälltes Eiweiß von gelöstem Eiweiß freigewaschen ist, empfohlen wird. Ich habe in allen Versuchen, in denen ich Eiweißniederschläge mit Ammonsulfatlösungen wusch, beobachtet, daß zu einer Zeit, wo das Filtrat beim Aufkochen noch einen starken Niederschlag absetzte, die Ferrocyanwasserstoffprobe bereits negativ ausfiel. Schuld an dem Versagen dieser Probe ist der Ammonsulfatgehalt des Filtrates, denn im dialysierten Filtrat fiel diese Probe wieder stark positiv aus. Ich habe daher stets, um zu untersuchen, ob das Filtrat bereits eiweißfrei ist, dasselbe nach Ansäuern aufgekocht. Blieb es dann vollkommen klar, dann betrachtete ich die Auswaschung als vollendet.

Nachdem also der Niederschlag in der angeführten Weise ausgewaschen war, wurde er abgepreßt, in 200 ccm  $\frac{1}{4}$ -gesät-

tiger Ammonsulfatlösung gelöst, die Lösung mit 1500 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufwies, nach mehreren Stunden vom entstandenen Niederschlag abfiltriert und der Eiweißgehalt des Filtrates bestimmt. Die Untersuchung ergab, daß das Filtrat vollständig eiweißfrei war.

Alle diese Versuche stimmen miteinander überein und beweisen, daß tatsächlich eine aus stark verdünntem Serum bei einer bestimmten Ammonsulfatkonzentration ausgefällte Eiweißfraktion in einer Ammonsulfatlösung von gleicher Konzentration vollständig unlöslich ist, daß daher der für dieselbe im Vergleich zur gleichen Ausfällung aus unverdünntem Serum gefundene geringere Wert nicht auf eine teilweise Lösung des Niederschlages in dem großen Flüssigkeitsvolumen bezogen werden kann.

Es muß daher dieser Wert der richtige und der bei Fällung aus unverdünntem Serum ein zu hoher, bedingt durch Mitgefälltwerden anderer, nicht zugehöriger Eiweißfraktionen, sein.

Daß es sich mit letzterem so verhält, beweist ein Versuch, den ich jetzt anführen werde und der den früheren vollständig analog angestellt wurde, nur mit dem Unterschiede, daß unverdünntes Serum verwendet wurde.

#### Versuch VI.

300 ccm Pferdeserum werden versetzt mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat erzielt wird. Von dem entstandenen Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.

200 ccm Filtrat werden versetzt mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Von dem entstandenen Niederschlage wird nach mehreren Stunden abfiltriert und im Filtrat der Eiweißgehalt bestimmt. Die Bestimmung ergibt in 10 ccm Filtrat:

a) 32,5150		b) 35,9042	
32,3592	0,1558	35,7468	0,1574.

Der Niederschlag wird scharf abgepreßt, in 200 ccm  $\frac{1}{4}$ -gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst und die Lösung wieder mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Vom entstandenen Niederschlag

wird wieder nach mehreren Stunden abfiltriert und der Eiweißgehalt des Filtrates bestimmt. Die Bestimmung ergibt in 10 ccm Filtrat:

a) 32,1272	0,0332	b) 37,6412	0,0352.
32,0940		37,6060	

Wieder wird der Niederschlag scharf abgepreßt in 200 ccm  $\frac{1}{4}$ -gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst, die Lösung mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltriert, im Filtrat eine Eiweißbestimmung gemacht, die in 20 ccm ergibt:

a) 35,8428	0,0158	b) 23,6600	0,0164.
35,8270		23,6436	

Derselbe Vorgang wird in der gleichen Weise nochmals wiederholt. Jetzt enthalten 20 ccm Filtrat Eiweiß:

a) 44,1400	0,0066	b) 22,4144	0,0080
44,1334		22,4064	

und erst nach nochmaliger Lösung und Wiederfällung in der gleichen Weise ist das Filtrat eiweißfrei.

Die Ausrechnung dieses Versuches ergibt: In 200 ccm des Filtrates eines bei  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat ausgefallenen Serums sind nach Ausfällung dieses Filtrates bei  $\frac{1}{2}$ -Sättigung mit Ammonsulfat 4,674 resp. 4,722 g gelöstes Eiweiß enthalten. Nach einmaliger Umfällung 0,996 resp. 1,056 g, nach abermaliger Umfällung 0,237 resp. 0,246 g, nach nochmaliger Umfällung 0,094 resp. 0 15 g und erst nach der vierten Umfällung ist kein gelöstes Eiweiß vorhanden.

Daß der erste, sehr hohe Wert nicht auf gelöstes Globulin, sondern auf Albumin des Serums zu beziehen ist, ist wohl zweifellos. Dies muß aber noch beim zweiten Werte zum Teile der Fall sein. Würde aber letzterer auf diese allein zu beziehen sein, dann müßten nach der Berechnung in dem abgepreßten Niederschlag noch über 60 ccm Flüssigkeit enthalten sein, was ja vollständig ausgeschlossen ist. Man wird daher zu dem Schlusse gezwungen, daß bei dieser Umfällung ein Teil des ursprünglichen Niederschlages in Lösung gegangen ist. Ebenso ergibt die Berechnung der übrigen Werte, daß bis zur letzten Umfällung immer wieder ein Teil des Niederschlages in Lösung gegangen sein muß.

Nachdem aber eine aus verdünntem Serum gefällte Eiweißfraktion in der gleich konzentrierten Ammonsulfatlösung, wie die früheren Versuche gezeigt haben, unlöslich ist, so ist die Annahme berechtigt, daß bei der Ausfällung aus unverdünntem Serum neben der betreffenden Eiweißfraktion noch andere nicht

hingehörige mitgerissen werden, die beim Umfällen allmählich wieder in Lösung gehen.

Die Versuche III, IV, V, VI weisen aber einen gemeinsamen Fehler auf. In ihnen ist nämlich der Ammonsulfatgehalt des Niederschlages nicht berücksichtigt. Wenn vielleicht auch nicht, wie man früher vielfach angenommen hat, der Niederschlag eine Doppelverbindung von Eiweiß und Ammonsulfat ist, sondern, wie Galeotti<sup>1)</sup> für krystallisiertes Eieralbumin fand, der Niederschlag nur aus Eiweiß besteht, so enthält er doch größere Mengen von Ammonsulfat, jedenfalls, wie die Vergleichung seines Wassergehaltes mit seinem Ammonsulfatgehalte ergibt, mehr, als der ammoniumsulfathaltigen Eiweißlösung, die ihn durchtränkt, entspricht.

Es ist nun selbstverständlich, daß, wenn ein solcher Niederschlag, wie dies in den Versuchen geschah, in  $\frac{1}{4}$ -gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst wird, die Lösung nicht mehr  $\frac{1}{4}$ -Sättigung, sondern eine höhere Konzentration mit Ammonsulfat zeigen muß. So möchte ich die Erscheinung erklären, daß in diesen Versuchen die Lösung stets eine leichte Opaleszenz zeigte, die erst nach Zusatz weniger Tropfen Wasser zur Lösung verschwand.

Es ist auch selbstverständlich, daß, wenn man zu 200 ccm dieser Lösung 100 ccm einer gesättigten Ammonsulfatlösung zufügt, wie dies in den Versuchen geschehen ist, nicht eine Halbsättigung mit Ammonsulfat, sondern eine etwas höhere Konzentration erzielt werden muß. Und man könnte zunächst glauben, daß die Resultate der Versuche IV und V durch diese Konzentrationszunahme der Lösungen von Ammonsulfat bei den Umfällungen vorgetäuscht wurden, daß die erhaltenen Niederschläge nicht, wie wir bewiesen zu haben glaubten, in der Ammonsulfatlösung von der betreffenden Konzentration unlöslich sind, sondern daß sie ungelöst blieben, weil die Konzentration der Ammonsulfatlösung gestiegen war.

Gegen diesen Einwand ist aber zu bemerken, daß der Zuwachs an Ammonsulfat, den die Lösung durch den Ammon-

<sup>1)</sup> Über die Gleichgewichte zwischen Eiweißkörpern und Elektrolyten I. Mitteil. Diese Zeitschrift Bd. 44, S. 461, 1905.

sulfatgehalt des Niederschlages erfährt, bei den großen Verdünnungen, die in diesen Versuchen gewählt wurden, gar nicht in Betracht kommt und der Ammonsulfatgehalt der Flüssigkeit kaum die Halbsättigung überschreitet. Daß aber wirklich nicht die vermeintliche Konzentrationserhöhung an Ammonsulfat schuld an dem Unlöslichbleiben des entstandenen Niederschlages ist, geht mit Sicherheit aus dem Ausfalle des Versuches III hervor, in welchem die Verdünnung des Serums nicht so weit getrieben wurde, daher eine Konzentrationserhöhung durch den Ammonsulfatgehalt des Niederschlages viel eher hätte zur Geltung gelangen müssen; im Gegenteil erwies sich eben wegen der zu geringen Verdünnung der Niederschlag bei den Umfällungen als teilweise löslich.

Anders verhält es sich in dem Versuche VI. Hier, wo keine Verdünnung stattfand, mußte der Zuwachs an Ammonsulfat in der Lösung durch den Ammonsulfatgehalt des Niederschlages deutlich zum Ausdruck kommen und das Resultat beeinflussen. Trotzdem erwies sich aber der Niederschlag nicht als unlöslich und es hätte bei Ausgleichung dieses Fehlers noch mehr von dem Niederschlage in Lösung gehen müssen. Der Gegensatz zwischen diesem Versuche und den Versuchen IV und V wäre noch deutlicher und der Beweis, daß im unverdünnten Serum noch fremde Eiweißfraktionen mitgefällt werden, noch augenfälliger gewesen.

Die aus den orientierenden Versuchen mit hämoglobinhaltigem Serum sich ergebende Vermutung hat sich demnach in jedem Punkte durch quantitative Untersuchungen bestätigt.

Aus unverdünntem Serum werden durch einen bestimmten Ammonsulfatzusatz außer der bei dieser Ammonsulfatkonzentration ausfällbaren Eiweißfraktion noch andere, bei höheren Ammonsulfatkonzentrationen ausfällbare Eiweißfraktionen mitgefällt, während aus stark verdünntem Serum nur die betreffende Eiweißfraktion ausgefällt wird. Der Wert, den man daher für das unverdünnte Serum findet, ist zu hoch, der Wert für das verdünnte der richtige.

Wie die Versuche weiter zeigen, gelingt es, durch mehrmaliges Umfällen allmählich immer mehr die aus unverdünntem

Serum ausgefällte Eiweißfraktion von den fremden Beimengungen zu befreien, und es fragt sich, ob man nicht zu demselben Ziele durch einfaches Auswaschen des Niederschlages gelangen könnte. Mit anderen Worten, ob doch die gewöhnlich geübte Bestimmung der einzelnen Eiweißfraktionen im Serum — Fällung aus unverdünntem Serum und nachträgliche Auswaschung mit der entsprechend konzentrierten Ammonsulfatlösung, bis das Filtrat eiweißfrei ist — ihre Geltung behält.

Um diese Frage zu entscheiden, habe ich zwei Arten von Versuchen angestellt. Bei der einen wurde der Niederschlag, der aus unverdünntem Serum erhalten wurde, solange mit der entsprechenden Ammonsulfatlösung gewaschen, bis die Waschflüssigkeit eiweißfrei war, und dann wurde nachgesehen, ob dieser Niederschlag noch durch Umfällung in Lösung gehende Bestandteile enthält, ob also die Auswaschung die vollständige Entfernung der Beimengungen bewirkt. Bei der zweiten Reihe von Versuchen wurde untersucht, ob durch Auswaschung des aus unverdünntem Serum gewonnenen Niederschlages das Gewicht desselben bis auf das Gewicht des aus verdünntem Serum gewonnenen und als den richtigen Wert anzusehenden herabgedrückt werden kann.

#### Versuch VII.

300 ccm Pferdeserum werden versetzt mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat erzielt wird. Von dem entstandenen Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.

200 ccm Filtrat werden versetzt mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert und auf dem Filter mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung so lange gewaschen, bis die abfließende Flüssigkeit eiweißfrei ist. Hierauf wird der Niederschlag scharf abgepreßt, in 200 ccm  $\frac{1}{4}$ -gesättigter Ammonsulfatlösung gelöst und die Lösung mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Hierauf wird der entstandene Niederschlag abfiltriert und im Filtrat eine Eiweißbestimmung gemacht. Dieselbe ergibt in 200 ccm Filtrat:

a)	22,4200		b)	23,6222	
	22,4160	0,0040		23,6188	0,0034

Es waren daher in 300 ccm der Flüssigkeit, also im gesamten Filtrate 0,06 g resp. 0,051 g gelöstes Eiweiß enthalten.

## Versuch VIII.

240 ccm Pferdeserum werden versetzt mit 80 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat erreicht wird. Von dem entstandenen Niederschlage wird nach mehreren Stunden abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.

1. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist.

Der entstandene Niederschlag wurde in der früher beschriebenen Weise bestimmt.

a) 1. 20,5174	2,5628	b) 1. 21,4764	2,6188
2. 17,9546	2,2344	2. 18,8576	1,9726
3. 15,7202	0,7000	3. 16,8850	0,6922
4. 15,0202		4. 16,1928	

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 27,9100		
2. 19,3564	8,5536	} 11,4714.
3. 16,4386	2,9178	

In 10 ccm Filtrat wird der Eiweißgehalt bestimmt.

a) 23,8434	0,1764	b) 22,5782	0,1794.
23,6670		22,3988	

Von dem gewogenen Eiweiß ist daher in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,1764 \times 2,5628}{8,5536} = 0,0528, \quad b) \frac{0,1794 \times 2,6188}{8,5536} = 0,0549.$$

Daher beträgt das Gewicht des Niederschlages:

$$a) 0,7000 - 0,0528 = 0,6472 \text{ g}, \quad b) 0,6922 - 0,0549 = 0,6373 \text{ g},$$

im Mittel **0,6422 g.**

2. 20 ccm Filtrat werden genau so wie bei 1. behandelt, d. h. mit 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und der entstandene Niederschlag aufs Filter gebracht.

Dann aber wird der Niederschlag am Filter mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, bis die abfließende Flüssigkeit eiweißfrei ist, und hierauf getrocknet, sulfatfrei gewaschen, abermals getrocknet und gewogen. Die Wägung ergibt:

a) 38,3930	0,5334	b) 36,4408	0,5316
37,8596		35,9092	

im Mittel **0,5325 g.**

3. 20 ccm Filtrat werden mit 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, dann mehrere Stunden stehen gelassen und hierauf werden noch 480 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter Ammonsulfatlösung zugefügt, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Das Ganze wird gut durchgerührt, nach mehreren Stunden der Niederschlag abfiltriert und in der wiederholt beschriebenen Weise bestimmt.

a) 1. 21,0216	4,1710	b) 1. 20,9292	4,1270
2. 16,8506	1,2848	2. 16,8022	1,3032
3. 15,5658	0,5220	3. 15,4990	0,5112
4. 15,0438		4. 14,9878	

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 31,8068	8,9300	} 11,1996.
2. 22,8768	2,2696	
3. 20,6072		

In 10 ccm Filtrat wird der Eiweißgehalt bestimmt. Es ergibt sich

a) 32,0938	0,0040	b) 44,1514	0,0032
32,0898		44,1482	

Von dem gewogenen Eiweiß ist daher in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,004 \times 4,1710}{8,9300} = 0,0027, \quad b) \frac{0,0032 \times 4,1270}{8,9300} = 0,0014.$$

Daher beträgt das Gewicht des Niederschlages:

$$a) 0,5220 - 0,0027 = 0,5193, \quad b) 0,5112 - 0,0014 = 0,5098, \\ \text{im Mittel } 0,5145 \text{ g.}$$

4. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 480 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird wie gewöhnlich bestimmt.

a) 1. 21,2446	3,5264	b) 1. 20,2504	3,2924
2. 17,7182	1,0266	2. 16,9580	1,0312
3. 16,6916	0,4796	3. 15,9268	0,4672
4. 16,2120		4. 15,4596	

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 28,6542	8,7202	} 11,2422.
2. 19,9340	2,5220	
3. 17,4120		

In 10 ccm Filtrat wird der Eiweißgehalt bestimmt. Es ergibt sich

a) 20,4186	0,0100	b) 13,7818	0,0090
20,4086		13,7728	

Von dem gewogenen Eiweiß ist daher in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,0100 \times 3,5264}{8,7202} = 0,0040, \quad b) \frac{0,009 \times 3,2924}{8,7202} = 0,0017.$$

Daher beträgt das Gewicht des Niederschlages:

$$a) 0,4796 - 0,0040 = 0,4756, \quad b) 0,4672 - 0,0017 = 0,4655, \\ \text{im Mittel } 0,4705 \text{ g.}$$

### Versuch IX.

240 ccm Pferdeserum werden versetzt mit 80 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat erzielt wird. Von dem entstandenen Niederschlage wird nach mehreren Stunden abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.



1. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und in der vielfach beschriebenen Weise bestimmt.

a) 1. 22,0212	3,2214	b) 1. 22,5232	3,4582
2. 18,7998	1,0546	2. 19,0650	1,1372
3. 17,7452	0,5422	3. 17,9278	0,5400
4. 17,2030		4. 17,3878	

10 ccm Filtrat wiegen:	1. 28,0140	8,5428	} 11,5750.
	2. 19,4712	3,0322	
	3. 16,4390		

In 10 ccm Filtrat wird eine Eiweißbestimmung gemacht. Dieselbe

ergibt:	a) 35,9590	0,1406	b) 13,9132	0,1368
	35,8184		13,7764	

Daher sind von dem gewogenen Eiweiß in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,1406 \times 3,2214}{8,5428} = 0,0530, \quad b) \frac{0,1368 \times 3,4582}{8,5428} = 0,0553.$$

Das Gewicht des Niederschlages beträgt daher:

$$a) 0,5422 - 0,0530 = 0,4892, \quad b) 0,5400 - 0,0553 = 0,4847, \\ \text{im Mittel } 0,4870 \text{ g.}$$

2. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert, auf dem Filter mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, bis die abfließende Flüssigkeit eiweißfrei ist, dann getrocknet, sulfatfrei gewaschen, abermals getrocknet und gewogen. Es ergibt sich:

a) 33,0210	0,4224	b) 32,7674	0,4228
32,5986		32,3446	

im Mittel 0,4226 g.

3. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, nach mehreren Stunden werden dann noch 480 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter Ammonsulfatlösung zugefügt, so daß wieder  $\frac{1}{2}$ -Sättigung mit Ammonsulfat erzielt ist. Das Ganze wird gut durchgerührt und der Niederschlag nach mehreren Stunden abfiltriert und in der bekannten Weise bestimmt.

a) 1. 21,9222	3,3480	b) 1. 21,6846	3,6602
2. 18,5742	1,0458	2. 18,0244	1,1256
3. 17,5284	0,4026	3. 16,8988	0,4014
4. 17,1258		4. 16,4974	

10 ccm Filtrat wiegen:	1. 31,6832	8,6710	} 11,3760.
	2. 23,0122	2,7050	
	3. 20,3072		

In 10 ccm Filtrat wird die Eiweißbestimmung gemacht. Dieselbe

ergibt:	23,6516	0,0018.
	23,6498	

Daher sind von dem gewogenen Eiweiß in Abzug zu bringen:

$$\text{a) } \frac{0,0018 \times 3,3480}{8,6710} = 0,0007, \quad \text{b) } \frac{0,0018 \times 3,6602}{8,6710} = 0,0007.$$

Es beträgt daher das Gewicht des Niederschlages:

$$\text{a) } 0,4026 - 0,0007 = 0,4019, \quad \text{b) } 0,4014 - 0,0007 = 0,4007, \\ \text{im Mittel } \mathbf{0,4013 \text{ g.}}$$

4. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 480 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesammte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird in der bekannten Weise bestimmt.

a) 1. 20,3878	3,2892	b) 1. 20,5940	2,9612
2. 17,0986	1,0286	2. 17,6328	0,8976
3. 16,0700	0,3818	3. 16,7352	0,3822
4. 15,6882		4. 16,3530	

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 28,7708	8,6580	} 11,3596.
2. 20,1128	2,7016	
3. 17,4112		

In 10 ccm Filtrat wird eine Eiweißbestimmung gemacht. Dieselbe ergibt:

a) 44,1830	0,0022	b) 20,3666	0,0030.
44,1808		20,3636	

Daher ist von dem gewogenen Eiweiß in Abzug zu bringen:

$$\text{a) } \frac{0,0022 \times 3,2892}{8,6580} = 0,0008, \quad \text{b) } \frac{0,0030 \times 2,9612}{8,6580} = 0,0010.$$

Es beträgt daher das Gewicht des Niederschlages:

$$\text{a) } 0,3818 - 0,0008 = 0,3810, \quad \text{b) } 0,3822 - 0,0010 = 0,3812. \\ \text{im Mittel } \mathbf{0,3811 \text{ g.}}$$

5. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 480 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert, mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, bis die Waschflüssigkeit eiweißfrei ist, dann getrocknet, sulfatfrei gewaschen, abermals getrocknet und gewogen.

Es ergibt die Wägung:

a) 38,2556	0,3826	b) 36,3536	0,3824
37,8730		35,9712	

im Mittel  $\mathbf{0,3825 \text{ g.}}$

Die Versuche VIII und IX stimmen vollständig miteinander überein. Sie bestätigen zunächst die schon in den Versuchen I und II enthaltene Tatsache, daß der Wägungswert des Niederschlages, den man bei einer bestimmten Ammonsulfatkonzentration aus unverdünntem Serum erhält, größer ist als der, den

man unter den gleichen Bedingungen aus verdünntem Serum erhält. Die Gewichtsabnahme ist hier sogar noch etwas größer als in den ersten Versuchen, so daß im Versuche VIII der Niederschlag aus verdünntem Serum nur 73,26%, im Versuche IX 78,25% des Niederschlages aus unverdünntem Serum beträgt.

Diese beiden Versuche zeigen ferner übereinstimmend, daß es durch Auswaschen des aus unverdünntem Serum gewonnenen Niederschlages nicht gelingt, die mitgefällten höheren Eiweißfraktionen vollständig zu entfernen, sondern daß nur ein Teil derselben auf diese Weise allmählich wieder gelöst wird, ein Teil aber ungelöst bleibt und erst beim Auflösen des Niederschlages in Lösung geht und durch Umfällen desselben, wie Versuch VII zeigt, allmählich von demselben getrennt werden kann. Worauf es beruht, daß nur ein Teil der Beimengungen ausgewaschen werden kann, vermag ich nicht anzugeben. Es könnte sein, daß eben ein Teil (vielleicht die bei den nächst höheren Ammonsulfatkonzentrationen ausfallenden Eiweißfraktionen) fester, der andere Teil (vielleicht die erst bei viel höheren Ammonsulfatkonzentrationen ausfallenden Eiweißfraktionen) viel lockerer an dem Niederschlag haftet und nur letzterer ausgewaschen werden kann. Eine andere Möglichkeit, die ich allerdings nur ganz hypothetisch vorbringen möchte, wäre die, daß durch die stete Berührung des Niederschlages mit einer relativ konzentrierten Ammonsulfatlösung der Niederschlag immer mehr Ammonsulfat aus dieser Lösung adsorbiert (oder bindet?), so daß, trotz Verhütung einer Verdunstung, die Ammonsulfatkonzentration auf dem Filter allmählich steigt und bei einer gewissen Höhe derselben kein Eiweiß mehr in Lösung geht. (Bei einigen Versuchen hat das Auswaschen viele Stunden gewährt.)

Für diese letztere Möglichkeit scheint mir der Umstand zu sprechen, daß das Sulfatfreiwaschen des koagulierten Eiweißes viel schwieriger ist und länger dauert, wenn der Niederschlag vorher mit Ammonsulfatlösungen vom überschüssigen Eiweiß befreit war.

Die beiden Versuche zeigen aber ferner noch übereinstimmend, daß es nicht gleichgültig ist, ob man das Serum

erst ausfällt und dann entsprechend verdünnt, oder ob man die Ausfällung erst in verdünntem Serum vornimmt. Im ersteren Falle gehen zwar noch die mitgefällten, fremden Eiweißfraktionen wieder in Lösung, aber nicht mehr vollständig, und der für den Niederschlag gefundene Wert ist zwar viel geringer, als wenn man das Serum nachträglich nicht verdünnt, aber doch noch höher, als wenn die Ausfällung in verdünntem Serum vorgenommen wird. Der Abstand von letzterem ist in den beiden Versuchen verschieden und dürfte vielleicht von der Zeit, die zwischen der Ausfällung und Verdünnung verstrichen ist, abhängig sein. Der Ausfall dieser beiden Teilversuche könnte freilich gegen die früher vermutungsweise ausgesprochene Erklärungsmöglichkeit, warum der aus unverdünntem Serum gewonnene Niederschlag durch Auswaschen mit Ammonsulfat nicht vollständig von den mitgefällten Beimengungen befreit werden kann, verwertet werden.

Schließlich zeigt noch der Versuch IX, was übrigens schon aus den Versuchen IV und V hervorgegangen war, daß man den aus verdünntem Serum erhaltenen Niederschlag ohne irgendwelchen Verlust mit Ammonsulfatlösung auswaschen kann, wofür ich noch als weitere Stütze den nächsten Versuch anführen will.

#### Versuch X.

180 ccm Pferdeserum werden mit 60 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, so daß  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit Ammonsulfat erzielt wird. Von dem erhaltenen Niederschlage wird nach mehreren Stunden abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.

1. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 480 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert und in der bekannten Weise bestimmt.

a) 1. 20,6006	3,6470	b) 1. 21,7818	3,4596
2. 16,9536	1,1484	2. 18,3222	1,1224
3. 15,8052	0,4006	3. 17,1998	0,4060
4. 15,4046		4. 16,7938	

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 31,7490	8,7732	} 11,4422.
2. 22,9758	2,6690	
3. 20,3068		

In 10 ccm Filtrat wird eine Eiweißbestimmung gemacht. Dieselbe ergibt:

$$\begin{array}{ll} \text{a) } 35,7440 & 0,0030 \\ & 35,7410 \end{array} \quad \begin{array}{ll} \text{b) } 32,3570 & 0,0036 \\ & 32,3534 \end{array}$$

Daher ist von dem gewogenen Eiweiß in Abzug zu bringen:

$$\text{a) } \frac{0,0030 \times 3,6470}{8,7732} = 0,0012, \quad \text{b) } \frac{0,0036 \times 3,4596}{8,7732} = 0,0014.$$

Das Gewicht des Niederschlages beträgt daher:

$$\text{a) } 0,4006 - 0,0012 = 0,3994, \quad \text{b) } 0,4060 - 0,0014 = 0,4046,$$

im Mittel **0,4020 g.**

2. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 480 ccm  $\frac{1}{2}$ -gesättigter und 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung mit Ammonsulfat aufweist. Nach mehreren Stunden wird der entstandene Niederschlag abfiltriert, auf dem Filter mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, bis die Waschflüssigkeit eiweißfrei ist, dann bei  $110^{\circ}$  getrocknet, sulfatfrei gewaschen, wieder getrocknet und gewogen. Es ergibt sich:

$$\begin{array}{ll} \text{a) } 25,3990 & 0,3960 \\ & 25,0030 \end{array} \quad \begin{array}{ll} \text{b) } 30,5624 & 0,3994 \\ & 30,1630 \end{array}$$

im Mittel **0,3977 g**, also so ziemlich den gleichen Wert, wie ohne Auswaschung auf Grund der Berechnung.

Aus allen Versuchen geht demnach hervor, daß, wenn man mit Ammonsulfat eine bestimmte Eiweißfraktion aus einem Serum frei von anderen Fraktionen erhalten will, die allgemein geübte Methode des Ausfällens und nachträglichen Auswaschens mit der entsprechend konzentrierten Ammonsulfatlösung nicht anwendbar ist, sondern daß man zunächst das Serum sehr stark verdünnen und in dem verdünnten Serum die Ausfällung vornehmen muß. Dann kann man verschieden verfahren. Entweder man wäscht den Niederschlag auf dem Filter mit der entsprechend konzentrierten Ammonsulfatlösung, bis die Waschflüssigkeit eiweißfrei ist, und wägt denselben nach Koagulierung, Sulfatfreiwaschung und Trocknung, oder man verzichtet auf die Auswaschung, bestimmt den Wassergehalt des feuchten Niederschlages, den Eiweiß- und Wassergehalt des Filtrates und zieht den aus diesen Zahlen berechneten Wert für das mitgewogene, aus der den Niederschlag durchtränkenden Eiweißlösung stammende, Eiweiß ab.

Erstere Methode erfordert mehr Zeit, letztere mehr Prozeduren und Wägungen. Freilich kann man sich, ohne einen

in Betracht kommenden Fehler zu begehen, einige Wägungen ersparen. Vor allem ist es nicht nötig, das Gewicht und den Trockenrückstand eines bestimmten Volumens des Filtrates zu bestimmen. Da es sich ja stets um sehr verdünnte Eiweißlösungen handelt und der geringe Eiweißgehalt das spezifische Gewicht wenig beeinflusst, so kann man das Gewicht des betreffenden Filtrates aus einer Tabelle ermitteln, in der die spezifischen Gewichte verschieden konzentrierter Ammonsulfatlösungen angegeben sind. Zu diesem Behufe habe ich eine solche Tabelle für die mich interessierenden Ammonsulfatkonzentrationen angelegt und in einer vor kurzem erschienenen Mitteilung<sup>1)</sup> veröffentlicht, da die von mir gefundenen Zahlen wesentliche Abweichungen von der allgemein gebräuchlichen Schiffschenschen Tabelle zeigten. Diese Differenzen sind zum großen Teile, wie ich in einer nachträglichen Bemerkung<sup>2)</sup> zu dieser Arbeit feststellte, darauf zurückzuführen, daß in der Schiffschenschen Tabelle von einem ganz anderen Gesichtspunkte die Konzentrationsberechnung der Ammonsulfatlösungen vorgenommen wurde. In der Schiffschenschen Tabelle bezieht sich der Ammonsulfatgehalt auf 100 g Lösung, in meiner auf 100 ccm Lösung. Viele wieder beziehen den Salzgehalt auf 100 g Lösungsmittel, meistens also Wasser. Es ist daher der Vorschlag Dekhuyzens,<sup>3)</sup> diese bestehende Verwirrung in den Begriffen über Prozentgehalt einer Flüssigkeit an Salzen nur zu begrüßen, der darauf hinausgeht, für den verschiedenen berechneten Prozentgehalt verschiedene Bezeichnungen zu wählen und diese Bezeichnungen jeder Prozentangabe beizufügen, um jeden Irrtum auszuschließen. Nach Dekhuyzen soll der auf 100 g Lösung bezogene Prozentgehalt mit  $^{\circ}P_{0s}$ , der auf 100 g Lösungsmittel bezogene mit  $^{\circ}P_{0D}$  und der auf 100 ccm Lösung bezogene mit  $^{\circ}V_{0s}$  bezeichnet werden. Leider ist dieser Vorschlag, wie ich glaube, relativ wenig bekannt und auch mir entgangen.

<sup>1)</sup> Über das spezifische Gewicht von Ammonsulfatlösungen. Diese Zeitschrift, Bd. 71, Heft 1, S. 120, 1911.

<sup>2)</sup> Bemerkung zu dem Aufsätze: Über das spezifische Gewicht von Ammonsulfatlösungen. Diese Zeitschrift, Bd. 71, H. 6, 1911.

<sup>3)</sup> Ein Kryoskop. Biochem. Zeitschrift, Bd. 11, S. 346, 1908.

Ursache davon ist wahrscheinlich der Umstand, daß dieser Vorschlag in einer Publikation enthalten ist, deren Titel denselben nicht ohne weiteres vermuten läßt. Es erscheint daher dankenswert, daß der Vorschlag vom Autor kürzlich wiederholt wurde.<sup>1)</sup>

Die Schiffsche Tabelle enthält also die Werte  $^{\circ}P_{0.8}$ , meine Tabelle die Werte  $^{\circ}V_{0.8}$ . Da letztere allein bei der Eiweißfällung in Betracht kommen, habe ich für diese Zwecke eine solche Tabelle angelegt und mich dabei auf die Bestimmung einiger weniger, bei Eiweißfällungen hauptsächlich in Betracht kommender Werte beschränkt.

Auch die Schiffsche Tabelle wäre für unsere Zwecke zu verwenden, nur müßte man jeden Wert von  $^{\circ}P_{0.8}$  auf  $^{\circ}V_{0.8}$  umrechnen. Dann würde man aber eben zu der von mir durch direkte Bestimmungen gefundenen Tabelle gelangen. Dennoch bleiben aber dann, wie ich bereits seiner Zeit feststellte, geringfügige Differenzen zwischen der aus der Schiffschen Tabelle ausgerechneten und der von mir angegebenen übrig. Worauf dieselben beruhen, vermag ich nicht anzugeben, möchte nur hervorheben, daß ich die spezifischen Gewichte mit zweierlei nachgeprüften Aräometern, zweierlei Aräopyknometern und einigemal noch mit dem Pyknometer bestimmt habe, wobei sich übereinstimmende Resultate ergaben, daß ferner die Bestimmung des Salzgehaltes in den verdünnten Lösungen sehr genau den aus der gesättigten Lösung berechneten Wert ergab, und daß die chemische Untersuchung des verwendeten Salzes seine vollständige chemische Reinheit erwies, schließlich daß die Sättigung der Lösung mit Ammonsulfat durch wiederholte Kontrollversuche festgestellt wurde.

Aus der von mir gegebenen Tabelle, die eventuell noch durch einige Werte ergänzt werden kann, kann man daher das Gewicht der Filtrate nach Abfiltrierung des Niederschlages ablesen und ebenso das Gewicht des Trockenrückstandes, der ja bei diesen Verdünnungen durch die minimalen Eiweißmengen, die er enthält, nicht nennenswert vermehrt wird. Die Differenz

<sup>1)</sup> Notiz zur Mitteilung von Wiener: Über das spezifische Gewicht von Ammonsulfatlösungen. Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 167, 1911.

dieser beiden Werte ergibt dann den Wassergehalt des Filtrates, der zur Berechnung des von der gewogenen Eiweißmenge abzuziehenden Wertes notwendig ist.

Zum Schlusse wollte ich mich nur noch überzeugen, ob dieselben Gesetze, die sich für die Fällungen des Serums bei Halbsättigung mit Ammonsulfat ergeben haben, auch für andere Konzentrationsgrade Geltung haben, ob sie also, was von vornherein zu erwarten war, allgemeinere Gültigkeit besitzen.

Zu diesem Zwecke wurde folgender Versuch XI ausgeführt, von dem ein Teil, der einer anderen Feststellung diente, bereits unter Versuch X wiedergegeben ist.

#### Versuch XI.

180 ccm Pferdeserum werden versetzt mit 60 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß  $\frac{1}{4}$ -Sättigung oder, wie wir hier sagen wollen, 2,5-Sättigung<sup>1)</sup> erzielt wird. Von dem entstandenen Niederschlage wird nach mehreren Stunden abfiltriert und das Filtrat weiter verwendet.

1. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit Halbsättigung oder 5-Sättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert und in der beschriebenen Weise bestimmt.

a) 1. 19,6462	3,2552	b) 1. 21,8706	3,5692
2. 16,3910	1,0010	2. 18,3014	1,1120
3. 15,3900	0,5428	3. 17,1894	0,5476
4. 14,8472		4. 16,6418	

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 27,9130		} 11,4738.
2. 19,3718	8,5412	
3. 16,4392	2,9326	

In 10 ccm Filtrat wird eine Eiweißbestimmung gemacht; dieselbe ergibt:

a) 35,9596	0,1332	b) 44,2670	0,1324.
35,8264		44,1346	

Daher ist von dem gewogenen Eiweiß in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,1332 \times 3,2552}{8,5412} = 0,0496, \quad b) \frac{0,1324 \times 3,5692}{8,5412} = 0,0546.$$

Das Gewicht des Niederschlages beträgt daher:

$$a) 0,5428 - 0,0496 = 0,4932, \quad b) 0,5476 - 0,0546 = 0,4930.$$

im Mittel **0,4931 g.**

<sup>1)</sup> Nomenklatur nach Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, II. Auflage, S. 147.



2. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 480 ccm halbgesättigter und 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit wieder Halbsättigung oder 5-Sättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert und in der beschriebenen Weise bestimmt. (Es ist dies jener Teil des Versuches, der unter Versuch X schon mitgeteilt ist, den ich aber der besseren Übersicht halber hier wiederhole.)

a) 1. 20,6006		b) 1. 21,7818	
2. 16,9536	3,6470	2. 18,3222	3,4596
3. 15,8052	1,1484	3. 17,1998	1,1224
4. 15,4046	0,4006	4. 16,7938	0,4060

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 31,7490		} 11,4422.
2. 22,9758	8,7732	
3. 20,3068	2,6690	

In 10 ccm Filtrat wird eine Eiweißbestimmung gemacht. Dieselbe ergibt:

a) 35,7440	0,0030	b) 32,3570	0,0036.
35,7410		32,3534	

Daher sind von dem gewogenen Eiweiß in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,003 \times 3,6470}{8,7732} = 0,0012, \quad b) \frac{0,0036 \times 3,4596}{8,7732} = 0,0014.$$

Das Gewicht des Niederschlages beträgt daher:

$$a) 0,4006 - 0,0012 = 0,3994, \quad b) 0,4060 - 0,0014 = 0,4046, \\ \text{im Mittel } 0,4020 \text{ g.}$$

3. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 10 ccm einer 70% gesättigten Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit 4-Sättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert. Die Filtration geht ebenso glatt vonstatten, wie bei Halbsättigung mit Ammonsulfat. Die Bestimmung des Niederschlages ergibt:

a) 1. 19,8310		b) 1. 20,3272	
2. 17,3420	2,4890	2. 17,9922	2,3350
3. 16,7350	0,6070	3. 17,4262	0,5660
4. 16,3472	0,3878	4. 17,0372	0,3890

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 28,6018		} 11,1908.
2. 19,8140	8,7878	
3. 17,4110	2,4030	

In 10 ccm Filtrat wird eine Eiweißbestimmung gemacht. Dieselbe ergibt:

a) 14,0014	0,1802	b) 20,5538	0,1804.
13,8212		20,3734	

Daher ist von dem gewogenen Eiweiß in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,1802 \times 2,4890}{8,7878} = 0,0510, \quad b) \frac{0,1804 \times 2,3350}{8,7878} = 0,0479.$$

Das Gewicht des Niederschlages beträgt daher:

$$a) 0,3878 - 0,0510 = 0,3368, \quad b) 0,3890 - 0,0479 = 0,3411.$$

im Mittel **0,3389 g.**

4. 20 ccm Filtrat werden versetzt mit 480 ccm 40% gesättigter und 10 ccm 70% gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß die gesamte Flüssigkeit 4-Sättigung mit Ammonsulfat aufweist. Der entstandene Niederschlag wird nach mehreren Stunden abfiltriert und in der bekannten Weise bestimmt.

a) 1. 18,3384 2. 16,7040 1,6344 3. 16,3100 0,3940 4. 16,1658 0,1442	b) 1. 19,1220 2. 17,4598 1,6622 3. 17,0580 0,4018 4. 16,9166 0,1414
--	--

10 ccm Filtrat wiegen:

1. 28,5040	}	11,1398.
2. 19,5184 8,9856		
3. 17,3642 2,1542		

In 10 ccm Filtrat wird eine Eiweißbestimmung gemacht. Dieselbe ergibt:

a) 37,6100 37,6018 0,0082	b) 32,1396 32,1316 0,0080.
------------------------------	-------------------------------

Daher ist von dem gewogenen Eiweiß in Abzug zu bringen:

$$a) \frac{0,0082 \times 1,6344}{8,9856} = 0,0016, \quad b) \frac{0,008 \times 1,6622}{8,9856} = 0,0014.$$

Das Gewicht des Niederschlages beträgt daher:

$$a) 0,1442 - 0,0016 = 0,1426, \quad b) 0,1414 - 0,0014 = 0,1400.$$

im Mittel **0,1413 g.**

Dieser Versuch ergibt in Übereinstimmung mit den früheren, daß bei Ausfällung der Halbsättigung mit Ammonsulfat im verdünnten Serum ein kleinerer Wert erhalten wird, als im unverdünnten und daß ersterer beiläufig denselben Bruchteil des letzteren, wie in den früheren Versuchen, nämlich 81,52% beträgt. Der Versuch zeigt aber weiter, daß auch bei einer anderen Ammonsulfatkonzentration, nämlich bei 4-Sättigung qualitativ dasselbe Resultat erhalten wird, daß aber in quantitativer Richtung das Ergebnis ein viel auffallenderes ist, indem der aus verdünntem Serum erhaltene Niederschlag nur 41,69% des aus unverdünntem Serum erhaltenen beträgt. Noch viel auffallender zeigt sich der Unterschied, wenn man die aus verdünntem Serum gewonnenen, von uns als richtig angesehenen

Zahlen als 100 setzt. Dann beträgt bei Halbsättigung mit Ammonsulfat der Wert aus unverdünntem Serum 122,66%, bei 4-Sättigung mit Ammonsulfat sogar 239,85% des Wertes aus unverdünntem Serum. Das bedeutet, daß im ersten Falle bei Ausfällung aus unverdünntem Serum 22,66%, im zweiten Falle 139,85%, also mehr, als die zu fällende Eiweißfraktion selbst beträgt, fremde Beimengungen, i. e. andere Eiweißfraktionen mitgefällt wurden.

Dieses auffallende Resultat bedurfte einer Erklärung. Folgende schien mir die plausibelste zu sein: Wenn man ein Serum bei einer bestimmten Ammonsulfatkonzentration ausfällt, so wird mit der bei dieser Konzentration ausfällbaren Eiweißfraktion desto mehr von anderen, bei höheren Ammonsulfatkonzentrationen ausfällbaren, Eiweißfraktionen mitgefällt, je näher die Fällungsgrenze letzterer der verwendeten Ammonsulfatkonzentration liegt. Bei Fällung mit Halbsättigung von Ammonsulfat wird das ganze Globulin ausgefällt, und bis zur beginnenden Albuminfällung ist ein relativ weites Spatium vorhanden. Daher wird nur relativ wenig Albumin, ca. 20–30% des Globulin-niederschlages, mitgefällt. Bei Fällung aber mit 40% Sättigung von Ammonsulfat ist noch bei der unmittelbar nächst höheren Konzentration fällbares Globulin vorhanden, von dem dann der größte Teil oder alles neben geringen Mengen von Albumin mitgefällt wird.

Um diesen Erklärungsversuch auf seine Stichhaltigkeit zu prüfen, habe ich folgenden Versuch angestellt:

#### Versuch XII.

Von einem Pferdeserum wurden

1. 44 ccm versetzt mit 960 ccm 4,5 gesättigter und 36 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß das gesamte Flüssigkeitsvolumen von 1040 ccm 4,5-Sättigung mit Ammonsulfat aufwies. Es entstand ein Niederschlag, von dem nach mehreren Stunden abfiltriert wurde.

Von dem Filtrate wurden 260 ccm, die 11 ccm Serum entsprachen, genommen und mit 50 ccm 7,6 gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, so daß das gesamte Flüssigkeitsvolumen von 311 ccm 5-Sättigung mit Ammonsulfat aufwies. Es entstand abermals ein dichter Niederschlag, der nach einigen Stunden eine mehrere Millimeter hohe Bodenschicht bildete. Dieser Niederschlag wurde dann abfiltriert, in einer

relativ geringen Menge Wasser gelöst und der Lösung solange Ammonsulfat zugesetzt, bis die erste bleibende Trübung auftrat. Bei diesem Punkte zeigte die Flüssigkeit ein spezifisches Gewicht von 1,127, dem nach meiner Tabelle resp. der aus meinen Werten konstruierten Kurve, wenn man den Eiweißgehalt vernachlässigte (derselbe betrug 0,05%), der Gehalt von 24 % Ammonsulfat entspricht. Da die gesättigte Lösung 54,6 % Ammonsulfat enthält, so entsprechen 24 % einer zu 4,51 gesättigten Lösung.

2. 41 ccm desselben Serums wurden versetzt mit 36 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, so daß das ganze Flüssigkeitsvolumen 4,5-Sättigung mit Ammonsulfat aufwies. Es entstand ein mächtiger Niederschlag, von dem nach mehreren Stunden abfiltriert wurde.

20 ccm des Filtrates, die wieder 11 ccm des Serums entsprachen, wurden hierauf versetzt mit 10 ccm einer 60% gesättigten Lösung, so daß das gesamte Flüssigkeitsvolumen von 30 ccm 5-Sättigung mit Ammonsulfat aufwies. Die Flüssigkeit blieb dauernd klar. Um nun diesen Versuch vollständig mit dem ersten vergleichbar zu machen und die Möglichkeit auszuschalten, daß vielleicht in dieser Lösung die gleiche Eiweißfraktion enthalten war, aber etwa durch die größere Konzentration des Albumins in Lösung gehalten wurde, habe ich eine ganz gleich hergestellte Lösung nachträglich noch mit 190 ccm 50% gesättigter Ammonsulfatlösung verdünnt. Auch dann blieb sie dauernd klar.

Dieser Versuch zeigt demnach, daß bei Ausfällung eines verdünnten Serums mit 4,5-Sättigung von Ammonsulfat eine beträchtliche Globulinfraktion in Lösung bleibt, die erst zwischen 4,5—5,0-Sättigung fällbar ist und bei einer Umfällung dieselben Fällungsgrenzen beibehält, daß hingegen bei der gleichen Ausfällung eines unverdünnten Serums diese Fraktion tatsächlich vollständig mitgefällt wird.

Der Ausfall dieses Versuches stellt daher einen Beweis für die Richtigkeit der oben vermutungsweise ausgesprochenen Erklärung dar.

Es ergibt sich sonach aus allen vorliegenden Versuchen, daß die Ausfällung eines Serums mit einer bestimmten Ammonsulfatkonzentration außer der bei dieser Konzentration ausfällbaren Eiweißfraktion noch Teile von anderen Fraktionen, die in reinem, isolierten Zustande erst bei höheren Ammonsulfatkonzentrationen sich als fällbar erweisen, mitgefällt werden und zwar desto mehr von denselben, je mehr von ihnen vorhanden ist und je näher ihre Fällungsgrenze der verwendeten

Ammonsulfatkonzentration liegt. Von diesen fremden Fraktionen kann nur ein Teil durch nachträgliches Auswaschen mit der entsprechend konzentrierten Ammonsulfatlösung wieder entfernt werden, während ein Teil auf diese Weise von dem Niederschlage nicht mehr getrennt werden kann.

Die allgemein gebräuchliche Methode der fraktionierten Eiweißfällung im Serum durch Ammonsulfat gibt daher stets unrichtige, und zwar zu hohe Werte. Schon der so erhaltene Wert für das Gesamtglobulin, also bei Fraktionierung des Serums mit Halbsättigung von Ammonsulfat ist zu hoch. Noch mehr aber übersteigen die nach der gebräuchlichen Methode gefundenen Zahlen die richtigen Werte, wenn man erstere verwendet, um das Globulin selbst in einzelne Fraktionen zu zerlegen. Auf den geringen Wert solcher Versuche hat übrigens schon Hammarsten und in letzter Zeit Haslam<sup>1)</sup> hingewiesen. Es sei auch diesbezüglich auf die Untersuchungen und die darauf fußenden Anschauungen Galeottis<sup>2)</sup> aufmerksam gemacht.

Bei Verwendung einer und derselben Ammonsulfatkonzentration, also z. B. bei der Ausfällung des Gesamtglobulins ist, wie die Versuche mit allmählich zunehmender Verdünnung zeigten, der Fehler um so größer, je weniger verdünnt das Serum ist. Dabei spielt aber offenbar nicht die Verdünnung der bei dieser Konzentration fällbaren Fraktion, sondern die Verdünnung der höheren Fraktionen, die bloß mit der ersteren mitgerissen werden, eine Rolle.

Daraus geht hervor, daß der z. B. für das Gesamtglobulin erhaltene Wert nicht nur ansteigt, wenn das Globulin zunimmt, sondern auch ansteigen muß, wenn andere Eiweißfraktionen, z. B. das Albumin eine Zunahme erfährt, wenn überhaupt durch irgend einen Umstand die Gesamtkonzentration des Eiweißes in die Höhe geht.

Vielleicht ist gerade auf diesen Umstand die Tatsache zurückzuführen, daß in den meisten Fällen nach den verschiedensten Eingriffen oder bei verschiedenen Krankheiten, bei denen

<sup>1)</sup> The separation of proteids. Journ. of physiol., Bd. 32, S. 266, 1905.

<sup>2)</sup> Über die Gleichgewichte zwischen Eiweißkörpern und Elektrolyten. II. Mitteil., Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 473, 1906.

sich der Gesamteiweißgehalt des Serums änderte, eine gleichsinnige Änderung im Globulingehalt konstatiert wurde, während der Albumingehalt sich nicht änderte (Langstein und Mayer<sup>1</sup>), Erben<sup>2</sup>) u. a.). Da man den Albumingehalt nie direkt, sondern nur den Gesamteiweißgehalt einerseits, den Globulingehalt anderseits bestimmt und die Differenz beider den Albumingehalt darstellt, so könnte natürlich bei einer Gesamteiweißvermehrung und vorgetäuschter Globulinvermehrung der Albumingehalt scheinbar unverändert geblieben sein und es könnte in solchen Fällen, oder wenigstens in einer Reihe solcher Fälle dasselbe Resultat ohne Globulinvermehrung — nur durch eine Albuminvermehrung vorgetäuscht worden sein. Jedenfalls bedürfen alle auf diese Weise angestellten Untersuchungen einer Revision.

Alle diese Fehler werden aber durch entsprechende Verdünnung des Serums verringert oder sogar vermieden. Die aus diesem verdünnten Serum erhaltenen Werte für Globulin sind erheblich kleiner, aber sie sind die richtigen, da der Niederschlag ausschließlich aus der der betreffenden Ammonsulfatkonzentration entsprechenden Eiweißfraktion besteht und keine weiteren Fraktionen enthält. An diesem geänderten Verhalten trägt einzig und allein die Verdünnung, und zwar vor allem die Verdünnung der fremden Eiweißfraktionen schuld und nicht, woran ebenfalls gedacht werden könnte, etwaige, mit der Verdünnung einhergehende Reaktionsänderungen.

Mit der Erprobung dieser Resultate in klinischen Fällen bin ich gegenwärtig beschäftigt.

Prag, im Juli 1911.

<sup>1</sup>) Über das Verhalten der Eiweißkörper des Blutplasmas bei experimentellen Infektionen. Hofmeisters Beiträge, Bd. 5, S. 69, 1904.

<sup>2</sup>) Studien über Nephritis. Zeitschr. f. klin. Mediz., Bd. 50, S. 411, 1904; Bd. 57, S. 39, 1906.