

Proteinstudien.¹⁾

I. Mitteilung.

Über die Darstellung von Eieralbuminlösungen mit wohldefinierter Zusammensetzung nebst den angewandten analytischen Methoden.

Von

S. P. L. Sörensen und Margrethe Höyrup.

(Mit 2 Figuren im Text.)

(Aus dem Carlsberg Laboratorium, Kopenhagen.)

(Der Redaktion zugegangen am 25. Mai 1918.)

A. Die Krystallisation des Eieralbumins und dessen Reinigung von Asche, Mucoid und Konalbumin.

Mit der Krystallisation beabsichtigt man die Beseitigung der in der von Globulin befreiten Eiweißlösung anwesenden Verunreinigungen, von welchen wir besonders auf die Aschenbestandteile, die stickstoffhaltigen, nicht koagulierbaren Stoffe, welche wir unter dem Namen «Mucoid» zusammenfassen, und auf die stickstoffhaltigen koagulierbaren, aber nicht krystallisierbaren Stoffe, die wir mit dem Sammelnamen «Konalbumin» bezeichnen, Rücksicht nehmen.

a) Die Krystallisationsmethode.

Bei der Auskrystallisation des Eieralbumins haben wir hauptsächlich die bekannte Methode von F. G. Hopkins und S. N. Pinkus²⁾ benutzt, indem wir Ammoniumsulfat und verdünnte Schwefelsäure für die Fällung gebraucht haben. Um eine wirkungsvolle Reinigung zu erreichen, haben wir den auskrystallisierten Niederschlag nach der Abfiltrierung mit einer Ammoniumsulfatlösung passender Stärke gewaschen.

¹⁾ Wird gleichzeitig in englischer Sprache in den Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, Bd. 12 (1916) veröffentlicht.

²⁾ Journ. of Physiol. Bd. 23, S. 130 (1898).

Das von uns befolgte Verfahren ist danach das folgende: Das Eiweiß von 60 frisch gelegten Eiern (ca. 2 Liter) wird mit einem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung vermischt und gut geschlagen, wonach der ausgeschiedene Niederschlag abfiltriert wird. Zu dem klaren rotgelben, nach Ammoniak riechenden Filtrat (ca. 3300 ccm) fügt man gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zur bleibenden Trübung (ca. 140 ccm) und dann bestimmt man, wie viel $\frac{n}{5}$ -Schwefelsäure zuzufügen ist, um einer herausgenommenen, gemessenen Probe des Filtrats eine der Krystallisation günstige Wasserstoffionenkonzentration zu erteilen. Beim Zusatz der $\frac{n}{5}$ -Schwefelsäure löst sich zuerst die oben erwähnte Unklarheit, dann geht die rotgelbe Farbe der Lösung in gelb über, und zuletzt scheidet sich ein amorpher, voluminöser Niederschlag aus, welcher sich anfangs leicht durch Rühren oder Schütteln löst, später aber immer schwieriger in Lösung zu bringen ist. Die dem Filtrat zuzufügende Säuremenge ist, um der Lösung eine der Krystallisation günstige Wasserstoffionenkonzentration beizubringen, so zu bemessen, daß der durch den Säurezusatz hervorgerufene Niederschlag sich durch Rühren eben wieder unter Bildung einer stark opaleszierenden Flüssigkeit löst; eine Portion wie die genannte verlangt 500—600 ccm $\frac{n}{5}$ -Schwefelsäure, gewöhnlich desto mehr, je älter die Eier sind.

Nachdem die Säure zugesetzt und gut gerührt worden ist, fängt die Krystallisation gewöhnlich im Laufe einer Stunde an, und sie wird durch häufiges Rühren oder Schütteln gefördert wie auch durch die Zufügung von etwas Impfungsmaterial (Krystallen mit anhängender Mutterlauge) von einer früheren Krystallisation. Wenn die Krystallisation in gutem Gange ist, wird die Masse beiseite gestellt während 2 bis 5 Tage bei gewöhnlicher Temperatur unter wiederholtem Rühren. Dann wird ohne Saugen an gewöhnlichen Filtern filtriert, und der Niederschlag des Waschens wegen auf mehrere Filter verteilt; für eine Portion wie die in Rede stehende werden 5 Filter von 24 Zentimeter angemessen sein. Sollte die Mutterlauge auch bis zum nächsten Tage nicht vollständig abgelaufen sein, läßt dieselbe sich mittels einer Pipette abziehen oder auch

vorsichtig abgießen, weil sich der Niederschlag ziemlich fest ans Filter anlagert.

Zur Ermittlung der Zusammensetzung der Waschflüssigkeit stellt man, in einer Reihe Probierröhrchen, Mischungen dar, von welchen jede 10 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung nebst wechselnden Mengen von Wasser enthält; zu jeder dieser Mischungen fügt man jetzt ein paar Kubikzentimeter des Filtrates. Findet man dann, daß z. B. die Mischung «10 ccm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung + 6,5 ccm Wasser» wie auch sämtliche salzreicheren Mischungen, durch diesen Zusatz von Filtrat unklar werden, während alle ammoniumsulfatärmeren Mischungen klar bleiben, wird eine Mischung von 10 Teilen gesättigter Ammoniumsulfatlösung mit 7 Teilen Wasser als Waschflüssigkeit benutzt. Mit dieser Mischung werden die Filter vollständig gefüllt, ohne daß der Niederschlag aufgerührt wird, und die Waschflüssigkeit verdrängt dann nach und nach die zwischen den Krystallen zurückgebliebene Mutterlauge.

Am nächsten Tage wird der möglich noch nicht durchgelaufene Teil der Waschflüssigkeit vom Niederschlag abgossen, wonach dieser so gut wie möglich mittels eines Porzellanlöffels von den Filtern abgeschabt und in eine geräumige Porzellanschale gebracht wird. Der an den Filtern hängende Rest wird in ausgekochtem Wasser durch Reiben mit einem Spatel gelöst, die erhaltene Lösung mit dem Niederschlag in der Schale vermischt, und so vieles ausgekochtes Wasser zugefügt, daß das Ganze durch gutes und wiederholtes Rühren vollständig in Lösung geht.

Die in dieser Weise erhaltene Lösung wird in ein Zylinderglas gegossen, und aufs neue dadurch zum Krystallisieren gebracht, daß man so lange gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugibt, als sich der augenblicklich entstehende Niederschlag durch gutes und anhaltendes Rühren eben wieder in Lösung bringen läßt. Bei häufig wiederholtem Umrühren und am leichtesten nach dem Zusatz etwas Impfungsmaterials fängt dann die Krystallisation bald wieder an, und das weitere Verfahren ist jetzt eine genaue Wiederholung des oben beschriebenen.

Wie es unten gezeigt werden soll, enthält das auskry-
stallisierte Eieralbumin schon nach 3 Krystallisationen so gut
wie nichts von Asche, Mucoïd oder Konalbumin, allein wir
haben immer sicherheitshalber 6 mal krystallisiert; die nach
der dritten und fünften Krystallisation erhaltenen Lösungen
wurden filtriert, um anwesendes Filtrierpapier und denaturiertes
Albumin zu beseitigen.

Beim Ausfällen des Eierglobulins sowie bei der ersten
Krystallisation kam gewöhnliches «reines» Ammoniumsulfat
zur Verwendung und ebenso bei der ersten Filtrierung ordinäres
Filtrierpapier. Bei allen späteren Operationen aber wurde
nur das reinste Ammoniumsulfat, das wir uns verschaffen
konnten (s. S. 23), und besonders reines ausgewaschenes Fil-
trierpapier (N. 590) von der Firma Schleicher & Schüll,
Düren, gebraucht, um nicht dem Eieralbumin Aschenbestand-
teile zuzuführen.

Die durch wiederholte Krystallisation vorwärtsschreitende
Reinigung des Eieralbumins ist durch mehrere Versuchsreihen
quantitativ verfolgt worden. Eine dieser Reihen mag hier als
erläuterndes Beispiel näher beschrieben werden.

Als Ausgangsmaterial benutzten wir 1 Liter der in der
oben beschriebenen Weise von Globulin befreiten Lösung von
Hühnereiweiß, dessen Gehalt an Asche, an koagulablen und
nicht koagulablen Stickstoffverbindungen im voraus bestimmt
worden war. Das Eieralbumin dieser Lösung wurde dreimal
auskrySTALLISIERT und sowohl in den dadurch erhaltenen Filtraten
und Waschflüssigkeiten, als auch in der durch Lösen des drei-
mal krystallisierten Niederschlags erhaltenen Endflüssigkeit
ebenfalls der Gehalt an Asche und die Verteilung des Stick-
stoffes ermittelt. Sämtliche zum Krystallisieren und Filtrieren
benutzten Gefäße und Filter wurden gut gewaschen und auch
die dadurch erhaltenen Lösungen (welche als «Reste» bezeichnet
werden) wurden analysiert. Das Resultat dieser Analysen ist
in der Tabelle 1¹⁾ (s. S. 20) zusammengestellt, und auf diese

¹⁾ Aus der untersten, mit «Summe» bezeichneten Reihe der Tabelle
ersieht man, daß, während die gesamte gefundene Menge von Asche sehr
nahe an 100% der ganzen anwesenden Menge ist, gegen 2% des Pro-

Tabelle wird bei der folgenden näheren Besprechung jeder einzelnen der hier behandelten Verunreinigungen: Asche, Mucoid und Konalbumin verwiesen.

b) Asche.

Die Eindampfung der zur Aschenbestimmung vorliegenden Lösung und das Wegbrennen des organischen Stoffes und der Ammoniumsalze wurden in einer genau gewogenen, geräumigen Platinschale vorgenommen, welche in einem elektrisch geheizten Heraeus-Muffelofen angebracht wurde. Der Ofen ließ sich leicht einstellen und zwar sowohl auf niedere Temperaturen unter 100° für die Eindampfung als auf höhere, welche die Veraschung und das Glühen verlangten. Um Verunreinigungen vom Ofenmaterial herrührend zu vermeiden, wurde das Innere des Ofens dermaßen mit Platinblech bekleidet, daß die Platinschale während des Prozesses nur mit Platin in Berührung kam. Im Schornstein des Ofens war eine Gasflamme angebracht, welche die übelriechenden Gasarten der Proteinverbrennung verbrannte. Sämtliche für die Aschenbestimmungen benutzten Lösungen enthielten entweder reichliches Ammoniumsulfat oder sie wurden vor der Einengung mit etwas von diesem Salz in fester Form versetzt, weshalb die basischen Bestandteile der Asche wesentlich als Sulfate zur Wägung gebracht worden sind. Die Asche wurde nach der ersten Wägung mit starker Schwefelsäure befeuchtet und dann nach Eintrocknen und kurzem Glühen wieder gewogen.

Aus der Tabelle 1, Stab 2 und 3, ersieht man, daß bei weitem der größte Teil der Asche durch die erste Krystallisation und Waschung beseitigt worden ist; doch finden sich auch noch im Filtrat II deutliche Aschenmengen, während die im Filtrat III und in der Endlösung vorgefundenen, minimalen Mengen im wesentlichen, wie wir gleich sehen werden, vom

teinstickstoffes fehlt. Diese Sachlage rührt gewiß davon her, daß es trotz einer so weit als möglich quantitativen Arbeitsweise uns nicht gelungen ist, allen Proteinstoff aus den benutzten großen Filtern auszuwaschen, und der Proteinstickstoff in den als «Reste» bezeichneten Lösungen sich deshalb zu niedrig beziffert.

Tabelle 1.

Die Reinigung des Eieralbumins durch KrySTALLISATION.

| Die ursprüngl. Lösg. | Aschenmenge in g | in Prozent der Gesamt- asche | Menge v. Stick- stoff in nicht- koagulier- baren Verbin- dungen («Mucoid-Stick- stoff») | in Proz. des ge- samten Mucoid- stickst. | Menge v. Stick- stoff in koagu- lierbaren Proteinstoffen in mg | in Prozent des ge- samten koagu- lierbar. Protein- stickstoffs | Koagulierbare, aber nicht krySTALLISIERBARE Albumine («Konalbumin») | | Eine Mut- terlage d. vorlieg. Konz. v. H. u. Am ₂ SO ₄ enthält v. kry- stalli- sierbar. Eihydrat per 100 g Wasser g | Die Mut- ter- lage enthält von Konal- bumin per 100 g Wasser g | Die Mutterlage enthält ausge- drückt in Prozent des ursprüngl. Gehalts an ko- gulierbaren Pro- teinstoffen von kry- stalli- sierbar. Protein | von kry- stalli- sierbar. Protein | von kry- stalli- sierbar. Protein |
|--------------------------------|---------------------|------------------------------------|---|--|--|--|--|---------------|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | Die Mutterlage enthält per 100 g Wasser | Eihy- drat | | | | | |
| 5,122 | 100,00 | 894,1 | 100,00 | 6608,7 | 100,00 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 4,545 | 88,73 | 803,8 | 89,90 | 1908,1 | 28,87 | 4,604 | 27,789 | 1,421 | ca. 0,274 | ca. 1,147 | ca. 5,57 | ca. 23,30 | — |
| Waschflüssigkeit I | 0,486 | 9,49 | 6,46 | 177,2 | 2,68 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Rest I | 0,039 | 0,76 | 0,49 | 53,0 | 0,80 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Filtrat II | 0,022 | 0,43 | 1,50 | 311,0 | 4,71 | 4,652 | 28,479 | 0,292 | 0,195 | 0,097 | 3,15 | 1,56 | — |
| Waschflüssigkeit II | 0,008 | 0,16 | — | 10,7 | 0,16 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Rest II | — | — | — | 44,8 | 0,68 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Filtrat III | 0,008 | 0,16 | 0,00 | 193,5 | 2,93 | 4,699 | 28,365 | 0,234 | 0,223 | 0,011 | 2,79 | 0,14 | — |
| Waschflüssigkeit III | 0,006 | 0,12 | — | 2,3 | 0,03 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Rest III | — | — | — | 37,5 | 0,57 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Endlösung | 0,006 | 0,12 | 0,00 | 3741,0 | 56,61 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Summe | 5,120 | 99,97 | 879,4 | 98,35 | 6479,1 | 98,04 | — | — | — | — | — | — | — |

Phosphorgehalt des Albumins herrühren. Die qualitative Untersuchung der Aschenproben hat nämlich das folgende Resultat gegeben:

Die Aschenproben von «der ursprünglichen Lösung», dem «Filtrat I», der «Waschflüssigkeit I» und dem «Rest I» verhielten sich ganz gleich. Sie lösten sich beinahe vollständig in Wasser zu einer nicht völlig klaren Lösung, welche nach Filtrierung neutral gegen Lackmus reagierte und reichliches Sulfat, aber kein Chlorid, kleine, aber deutliche Mengen Calciumsalze, aber nur eine Spur von Phosphaten enthielt. Auch der in Wasser unlösliche Teil enthielt nur eine Spur von Phosphaten. Die Phosphorsäure des genuinen Eiweißes ist wohl zusammen mit dem Globulin als Calciumphosphat oder Magnesiumammoniumphosphat aus der ammoniakalischen Flüssigkeit hinausgefallen.

Der wässerige Auszug der Asche des «Filtrats II» gab eine deutliche Reaktion auf Sulfat, nur aber eine ganz schwache auf Phosphat. Indessen wurde bei nachfolgender Behandlung der Platinschale, welche an einzelnen Stellen mit kleinen, grauen Flecken besetzt war, mit ganz schwacher Salpetersäure eine Lösung erhalten, welche schwach auf Calciumsalze, aber deutlich auf Phosphorsäure reagierte.

Der wässerige Auszug der Asche des «Filtrates III» gab eine schwache, aber sichere Reaktion auf Sulfat, auf Phosphat aber nur eine zweifelhafte. Ein mit schwacher Salpetersäure dargestellter Auszug enthielt nur schwache Spuren von Calciumsalz, Phosphorsäure dagegen in leicht nachweisbaren Mengen.

Der wässerige Auszug von der Asche der Endlösung endlich gab nur eine äußerst schwache Reaktion auf Sulfat, keine Reaktion auf Calcium, dagegen aber eine schwache auf Phosphorsäure. An der Platinschale fanden sich zahlreiche graue Flecken, welche durch Behandlung mit warmer, ganz schwacher Salpetersäure fast völlig verschwanden; die salpetersaure Lösung enthielt kein Calciumsalz, aber deutlich wahrnehmbare Mengen von Phosphorsäure. Es kann deshalb kaum in Zweifel gezogen werden, daß die grauen Flecken Phosphor, wahrscheinlich mit Platin verbunden, enthalten. Damit steht es

auch in guter Übereinstimmung, daß die Platinschale durch jede Aschenbestimmung mit nachfolgender Reinigung ein paar Milligramm des Gewichtes einbüßte. Dieser Phosphor rührt gewiß nicht von etwaigen Verunreinigungen her, sondern stammt aus dem Albumin selbst, indem dieses nach den Analysen Thomas B. Osbornes und G. F. Campbells¹⁾ 0,12% Phosphor enthält. Nimmt man hierauf Rücksicht und bedenkt man noch dazu, daß diejenige «Asche», welche aus der Endlösung gewonnen war, nur eine äußerst geringe Spur von Sulfat und kein Calciumsalz enthielt, dann darf man wohl ohne Bedenken sagen, daß die Lösung des Eieralbumins schon nach drei Krystallisationen desselben praktisch genommen aschenfrei ist.²⁾

Die größte Schwierigkeit bei der Darstellung von aschenfreien Eieralbuminlösungen liegt in der Beschaffung von hinlänglich reinem Ammoniumsulfat. Auch das reinste Produkt des Handels, von der Firma C. A. F. Kahlbaum, Berlin «Zur Analyse mit Garantieschein», ist nicht immer für diesen Gebrauch rein genug. Wir haben in 100 g von solchen Ammoniumsulfatpräparaten oft 2—5 mg, ja einmal sogar 9 mg Asche gefunden, welche bisweilen Calciumsulfat und oft reichliches Phosphat enthielt. Daß es sich hier wirklich um Phosphorsäure handelt und nicht etwa um Arsensäure, was eher zu

¹⁾ Journ. Amer. Chem. Soc., Bd. 22, S. 440 (1900).

²⁾ In diesem Zusammenhang soll noch ein Versuch angeführt werden, welcher mit einer Lösung von 6 mal umkrystallisiertem und danach durch Dialyse von Ammoniumsulfat befreitem Eiweiß gemacht wurde. Nach Zusatz von gleichen Teilen $n/1$ -Essigsäure und $n/1$ -Natriumacetatlösung wurde die Lösung koaguliert, der Niederschlag abfiltriert, mit warmem Wasser ausgewaschen und danach mehreremal mit absolutem Alkohol ausgekocht. Der alkoholische Auszug wurde in einer Platinschale auf dem Wasserbad zum Trocknen eingedampft, und gab einen kaum sichtbaren Rückstand. Dieser Rückstand wurde mit einer alkalischen Lösung von Natriumnitrat befeuchtet, wieder eingetrocknet und geglüht; der Glührest enthielt keine nachweisbare Spur von Phosphat. Auch das koagulierte mit Alkohol ausgekochte Eieralbumin wurde mit Natriumnitratlösung gefeuchtet, getrocknet und geglüht. Der Glührest enthielt reichliche Mengen von Phosphat. Dieses Resultat spricht zugunsten der Anschauung E. G. Willcocks und W. B. Hardys (Proc. Cambridge Philos. Soc., Bd. 14, S. 119 [1907] zitiert nach dem Chem. Zentralbl. 1907, II, S. 821), nach welcher der Phosphor einen integrierenden Teil des Proteinmoleküls ausmacht.

erwarten war, ist durch Verwandlung des mittels Ammoniummolybdat gebildeten gelben Niederschlages in Magnesiumammoniumphosphat mit nachfolgender Untersuchung in Marshs Apparat gezeigt worden. Die Firma C. A. F. Kahlbaum hat es indessen auf unsere Bitte bereitwilligst unternommen, ein mit besonderer Sorgfalt gereinigtes Ammoniumsulfat darzustellen, welches in 100 g weniger als 1 mg Asche enthält. Erst die Anwendung solches sehr reinen Ammoniumsulfates ermöglicht die Darstellung von aschefreiem Eialbumin.

(Mit Rücksicht auf den möglichen Inhalt des Ammoniumsulfats an «Überschuß» von Schwefelsäure oder Ammoniak verweisen wir auf die Abhandlung II).

c) Mucoid.

Wie schon erwähnt, benutzen wir den Namen Mucoid als gemeinschaftliche Benennung sämtlicher im Eiweiß anwesenden, stickstoffhaltigen Stoffe, welche durch Erwärmen nicht koagulieren, und die Bestimmung des Mucoidstickstoffes geschieht dementsprechend dadurch, daß man aus dem Filtrat von den koagulierten Proteinstoffen das Ammoniak wegschafft und dann im Rest den Totalstickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Bezüglich der Einzelheiten dieses Verfahrens wird auf Abschnitt D, Stickstoffbestimmungen, verwiesen; hier soll nur ein einzelner Punkt hervorgehoben werden, welcher bei der Analyse einigermaßen reiner Eialbuminlösungen keine Rolle spielt, der aber von Belang ist, sobald man Lösungen zu analysieren hat, in welchen die meisten der Bestandteile des genuinen Eiweißes noch vorhanden sind.

In einer früheren Abhandlung¹⁾ ist darauf aufmerksam gemacht worden, daß diejenige Menge von Stickstoff, welche beim Erwärmen einer globulinfreien, übrigens aber genuinen Eiweißlösung in der Lösung bleibt, von einer Reihe verschiedener Faktoren abhängt, und zwar außer von der Wasserstoffionenkonzentration und dem Salzgehalt, welche beide immer

¹⁾ S. P. L. Sörensen und E. Jürgensen, Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, Bd. 10, S. 1 (1910) und Biochem. Zeitschr., Bd. 31, S. 397 (1911).

bei der Koagulation der Eiweißstoffe von größerem oder kleinerem Belang sind, auch noch von der Dauer des Erhitzens und von der Menge des auskoagulierten Niederschlages. Beabsichtigt man jetzt — wie bei den in der gegenwärtigen Abhandlung beschriebenen Reinigungsversuchen — einen Vergleich der Mengen nicht koagulierbarer Eiweißstoffe, welche sich einerseits in der als Ausgangsmaterial dienenden Lösung vorfinden, und die andererseits in der beim Krystallisieren erhaltenen eiweißärmeren, aber ammoniumsulfatreicheren Mutterlauge enthalten ist, dann ist es notwendig, die Probe des Ausgangsmaterials vor dem Erhitzen derart mit einer angemessenen Ammoniumsulfatlösung zu verdünnen, daß sich die Koagulation der beiden Proben so weit als möglich unter gleichen Umständen vollzieht. Dieser Bedingung haben wir selbstverständlich Rechnung getragen in unseren Versuchen, dessen Resultate sich in der Tabelle 1 S. 20 wiedergegeben finden.

Die im vierten und fünften Stab der Tabelle mitgeteilten Zahlen zeigen, daß die Entfernung des Mucoids im großen und ganzen eben so glatt verläuft wie die Beseitigung der Asche. Weit der größte Teil des Mucoids wird durch die erste Krystallisation entfernt, und nach drei Krystallisationen ist die Menge so geringfügig, daß es sich in dieser Weise nicht nachweisen läßt.

d) Konalbumin.

Während somit der Aschengehalt und der Gehalt an nicht koagulierbaren Stickstoffverbindungen sich einigermaßen leicht genau ermitteln lassen, gilt dasselbe nicht für den Gehalt an koagulierbarem, aber nicht krystallisierbarem Eieralbumin, die, wie schon erwähnt, unter dem Sammelnamen Konalbumin zusammengefaßt werden. Unter den bei dem gewöhnlichen reinerungshalber stattfindenden Umkrystallisieren des Albumins innezuhaltenden Bedingungen (Konzentration der Wasserstoffionen und des Ammoniumsulfats) fällt nämlich das gesamte krystallisierbare Albumin niemals völlig aus, und die Mutterlauge wird deshalb immer neben dem nicht krystallisierbaren auch noch krystallisierbares Eieralbumin enthalten. Die Menge

des letzteren wird, wie es des näheren in der Abhandlung IV besprochen wird, von einer ganzen Reihe von Umständen abhängig sein, und zwar besonders von der Wasserstoffionenkonzentration und dem Ammoniumsulfatgehalt der Lösung, von der Temperatur und der Dauer der Krystallisation, aber wahrscheinlich auch von den Verunreinigungen der Mutterlauge und von der Häufigkeit des Rührens oder Schüttelns während der Krystallisation. Dessenungeachtet haben wir jedoch gemeint, uns einigermaßen zuverlässige Schätzungen darüber bilden zu können, inwieweit die Reinigung des Eieralbumins durch wiederholte Krystallisationen auch mit Bezug auf das Konalbumin eine effektive ist, indem wir das folgende Verfahren angewandt haben.

Die zu untersuchende Mutterlauge wurde analysiert und ihr Gehalt an Ammoniumsulfat und an Eihydrat per 100 g Wasser berechnet, indem für die ganze vorhandene Menge Proteinstickstoff der Faktor $x = 7,86^1)$ gesetzt wurde. Dann wurde mittels der in der Abhandlung IV mitgeteilten Untersuchungen über das zwischen dem auskrystallisierten Eieralbumin einerseits und der umgebenden Mutterlauge andererseits bestehende Gleichgewichtsverhältnis eingeschätzt, wie viel krystallisierbares Eihydrat per 100 g Wasser unter den obwaltenden Verhältnissen (Konzentration des Ammoniumsulfats und der Wasserstoffionen, Temperatur und Krystallisationsdauer) in der Mutterlauge vorhanden sein sollte, indem wir voraussetzten, was wahrscheinlich nicht ganz richtig ist, daß kein anderer Umstand als die hier genannten, z. B. auch nicht ein eventueller Inhalt an Konalbumin, die Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Krystallisation beeinflusste. Mittels eines Vergleiches des in dieser Weise «berechneten» Gehalts an krystallisierbarem Eihydrat und des gefundenen Gehalts an Eihydrat überhaupt konnte dann die vorhandene Menge nicht krystallisierbaren Eihydrats eingeschätzt werden. Als ein erläuterndes Beispiel sollen die Einzelheiten der Untersuchung

¹⁾ Die Bestimmung dieser Größe betreffend wird auf die Abhandlungen III und V verwiesen. Die Größe x gibt den Faktor an, mit welchem das Gewicht des Proteinstickstoffes zu multiplizieren ist, um das Gewicht der entsprechenden Eihydratmenge zu geben.

des Filtrates I der in der Tabelle 1 (S. 20) wiedergegebenen Versuchsreihe mitgeteilt werden. Die Analyse dieses Filtrates ergab, daß 100 g desselben enthielten:

| | |
|------------------------------------|---|
| 0,331 g Asche | 0,331 g Asche, |
| 4,524 » Ammoniak-N, äquivalent mit | 21,337 » $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, |
| 0,1388 » «koag. Ei-N» » » | 1,091 » koag. Eihydrat |
| und 0,0584 » «nichtkoag. Ei-N» » » | 0,459 » Mucoïd |
| nebst | 76,782 » Wasser |
| | 100,000 g. |

Auf 100 g Wasser kommen somit $\left\{ \begin{array}{l} 27,789 \text{ g } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \\ 1,421 \text{ » koag. Eihydrat} \end{array} \right.$

Die Dauer der Krystallisation war 4 Tage bei Zimmertemperatur (18°) und die Wasserstoffionenkonzentration des Filtrats I entsprach dem $p_{\text{H}} = 4,604$.

Aus der in der Abhandlung IV gegebenen graphischen Darstellung der Versuche über den von der Ammoniumsulfatkonzentration geübten Einfluß auf das Gleichgewicht des auskrystallisierten Albumins einerseits und der umgebenden Mutterlauge andererseits ist nun zu ersehen, daß, wenn eine Mutterlauge eine dem $p_{\text{H}} = 4,85$ entsprechende Wasserstoffionenkonzentration besitzt und auf 100 g Wasser 27,789 g Ammoniumsulfat enthält, sie nach Krystallisation in 4 Tagen bei 18° 0,422 g Eihydrat in 100 g Wasser enthalten wird.

Nun entspricht aber die Wasserstoffionenkonzentration des Filtrats I nicht dem $p_{\text{H}} = 4,85$, sondern dem $p_{\text{H}} = 4,604$, und bei dieser letzteren Konzentration ist die Krystallisation — alles Übrige gleich — vollständiger als bei der ersteren. Aus der in der Abhandlung IV mitgeteilten Darstellung von dem Einfluß, welchen die Wasserstoffionenkonzentration auf das Gleichgewicht zwischen auskrystallisiertem Eihydrat und Mutterlauge ausübt, ersieht man durch Benutzung der einer 5tägigen Krystallisationsdauer bei 18° entsprechenden mittleren Kurve des oberen Kurvenbündels, daß eine Mutterlauge mit 25,947 g Ammoniumsulfat in 100 g Wasser

0,640 g Eihydrat in 100 g Wasser bei $p_{\text{H}} = 4,85$ enthält und

0,412 » » » 100 » » » $p_{\text{H}} = 4,604$.

Die letztgenannte Mutterlauge wird demnach nur 0,644 mal soviel Eihydrat wie die erstere enthalten.

Weiter ersieht man durch Benutzung der auch einer 5tägigen Krystallisationsdauer bei 18° entsprechenden mittleren Kurve des untersten Kurvenbündels, daß eine Mutterlauge mit 27,121 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per 100 g Wasser

0,326 g Eihydrat in 100 g Wasser bei $p_{\text{H}} = 4,85$ enthält und

0,212 „ „ „ 100 g „ „ „ $p_{\text{H}} = 4,604$.

Auch bei dieser Ammoniumsulfatkonzentration wird somit die Eihydratmenge bei $p_{\text{H}} = 4,604$ ein ähnlicher Bruchteil wie oben, und zwar 0,650, derjenigen bei $p_{\text{H}} = 4,85$ sein.

Es wird somit die Annahme, daß das Verhältnis bei der Ammoniumsulfatkonzentration 27,789 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per 100 g Wasser ein ganz entsprechendes ist, keinen wesentlichen Fehler bedingen, und da nun der Eihydratgehalt einer Mutterlauge mit dieser Salzkonzentration und mit $p_{\text{H}} = 4,85$, wie oben (S. 26) genannt, 0,422 g in 100 g Wasser sein wird, so wird die dem $p_{\text{H}} = 4,604$ entsprechende Menge etwa $0,422 \cdot 0,65 = \text{ca. } 0,274$ g in 100 g Wasser sein.

Das Resultat dieser Schätzung wird also, daß eine Mutterlauge, welche, wie das Filtrat I, durch eine 4tägige Krystallisation gewonnen ist, 27,789 g Ammoniumsulfat in 100 g Wasser enthält und eine dem $p_{\text{H}} = 4,604$ entsprechende Wasserstoffionenkonzentration hat, ca. 0,274 g krystallisierbares Eihydrat in 100 g Wasser enthält. Da nun die gesamte gefundene Menge Eihydrats = 1,421 g in 100 g Wasser ist, so wird die in 100 g Wasser enthaltene Menge nicht krystallisierbares Eihydrat $1,421 \div \text{ca. } 0,274 = \text{ca. } 1,147$ g sein.

Mittels einer völlig analogen Betrachtung haben wir gefunden, daß die Filtrate II und III beziehungsweise ca. 0,195 und ca. 0,223 g krystallisierbares Eihydrat in 100 g Wasser enthalten müssen, und das heißt, wie die Zahlen der Tabelle 1, Stab 12 und 14 zeigen, daß in dem Filtrat II noch ein geringer, aber sicher nachweisbarer Gehalt an Konalbumin vorhanden ist, während das mit Bezug auf Filtrat III nicht mehr der Fall ist.

Also verhält sich das Konalbumin wie die Asche und das Mucoïd der genuinen Eieralbuminlösung: die Hauptmenge

verschwindet schon bei der ersten Umkrystallisation mit angehöriger Waschung, und nach drei Krystallisationen bleibt es wahrscheinlich nur in Spuren zurück.

In diesem Zusammenhang verweisen wir auf den S. 45 beschriebenen Versuch sowie auch auf diejenigen, die in Abhandlung IV unter dem Abschnitt über den Einfluß der Proteinkonzentration auf das Gleichgewicht besprochen sind. Es ist dort ein Hinweis darauf gegeben, daß das krystallisierbare Eieralbumin möglicherweise nach und nach in geringerem Grade sich in nicht krystallisierbares, aber völlig koagulables Albumin umwandelt.

Vollständigkeitshalber führen wir schließlich an, daß wir mehrere Versuchsreihen ganz ähnlicher Art wie diejenigen der Tabelle 1 entsprechenden ausgeführt haben, indem wir die Versuchsbedingungen ein wenig abänderten, z. B. haben wir die Krystallisation bei Eisschranktemperatur vorgehen lassen, oder unter Zusatz von etwas Ammoniak mit nachfolgender Zugabe der äquivalenten Menge Schwefelsäure oder umgekehrt. Als ein Beispiel letzterer Art der Krystallisation teilen wir nun das folgende mit: Zu 550 ccm einer Lösung von einmal krystallisiertem und gewaschenem Eieralbumin wurden 20 ccm $n/1$ -Schwefelsäure und 200 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung gegeben; nach Stehenlassen während einer Stunde wurden 20 ccm $n/1$ -Ammoniak und dann gesättigte Ammoniumsulfatlösung zur bleibenden Unklarheit (etwa 150 ccm) zugesetzt. Die Absicht dieses Verfahrens war natürlich zu versuchen, inwieweit eventuelle am Eieralbumin gebundene basische Stoffe sich durch eine solche vorläufige Säurebehandlung leichter als in der üblichen Weise beseitigen ließen. Die Resultate aller von uns angestellten Versuche entsprechen indessen in jeder Beziehung den in der Tabelle 1 wiedergegebenen.

Wir meinen aus diesen Versuchen schließen zu dürfen, daß das Eieralbumin sich ohne Schwierigkeiten von Asche, Mucoid und Konalbumin befreien läßt. Ein genaueres Durchgehen des Zahlenmaterials gibt zwar eine An-

deutung davon, daß die Aschenbestandteile etwas leichter als das Mucoid, und dieses wieder leichter als das Konalbumin wegzuschaffen ist, es muß aber doch angenommen werden, daß keine dieser drei Verunreinigungen nach drei Krystallisationen mit den gehörigen Waschungen in nennenswerten Mengen vorhanden ist. Da nichtsdestoweniger das gesamte Ausgangsmaterial unserer in den folgenden Abhandlungen beschriebenen Versuche aus Eieralbumin dargestellt worden ist, welches wenigstens sechsmal krystallisiert ist, so dürfen wir dasselbe als von den hier erwähnten Verunreinigungen frei ansehen.

B. Die Reinigung des Eieralbumins von Ammoniumsulfat durch Dialyse.

Nach ausgeführter Reinigung des Eieralbumins durch Krystallisation war die nächste Aufgabe die, das anwesende Ammoniumsulfat so vollständig als möglich wegzuschaffen, was selbstverständlich durch Dialyse geschehen mußte. Es erwies sich aber als unmöglich, durch einfache Dialyse reinem Wasser gegenüber jede Spur der Bestandteile des Ammoniumsulfats, besonders des Ammoniaks, zu beseitigen. Dies ist nicht auffallend, wenn man sich erinnert, daß das Albumin ein amphoterer Körper ist, welcher sowohl saure wie basische Stoffe zu binden vermag, und zwar besonders die letzteren, weil beim Eieralbumin der saure Charakter der vorherrschende ist. Wir haben es unter diesen Umständen zweckdienlich gefunden, die Dialyse in der Weise zu leiten, daß alle Schwefelsäure entfernt wird, was leicht zu erreichen ist, wenn man zu angemessenen Zeitpunkten und in angemessenen Zwischenräumen der Albuminlösung ein wenig Ammoniak zugibt, wodurch noch am Albumin gebundene Schwefelsäure in Ammoniumsulfat umgewandelt und wegdialysiert wird. Nach vollkommener Beseitigung der Schwefelsäure ist man natürlich außerstande, das Eieralbumin ganz von Ammoniak durch Dialyse zu befreien. Das als eine Säure wirkende Eieralbumin vereinigt sich nämlich mit dem Ammoniak zu einem Ammoniumsalz und nur

der Überschuß an Ammoniak dialysiert leicht weg, später dialysiert nur das durch die Hydrolyse des Ammoniumsulfates freigewordene Ammoniak, und die Menge desselben wird während der Dialyse immer kleiner. Da es nun möglich ist, kleine Ammoniakmengen mit ziemlich großer Genauigkeit zu bestimmen, so haben wir bei der Dialyse schließlich folgenderweise verfahren:

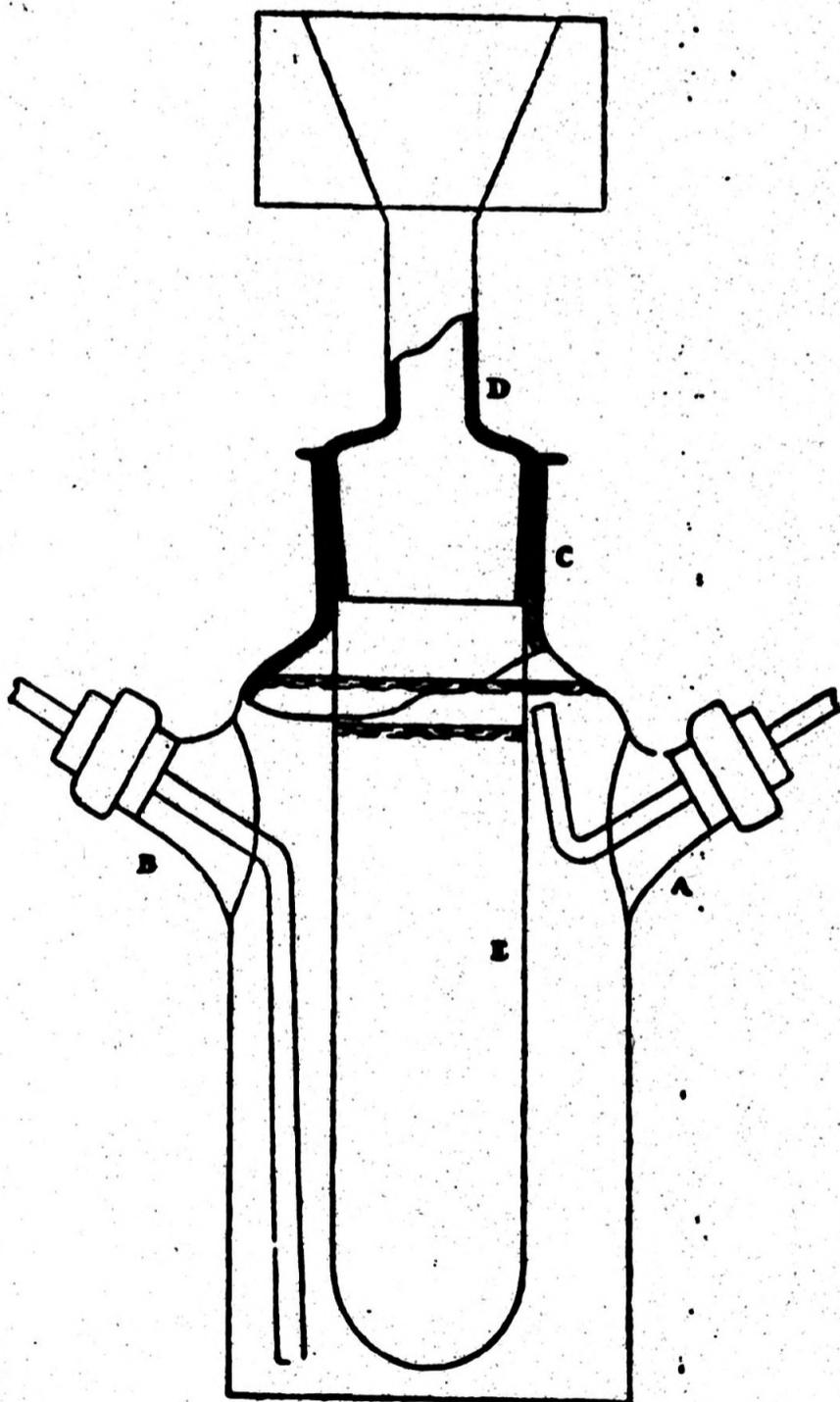
Erst wird während etwa einer Woche gegen ausgekochtes destilliertes Wasser dialysiert, wodurch weit der wesentlichste Teil des Ammoniumsulfates entfernt wird. Danach wird der Eieralbuminlösung so vieles $\frac{n}{1}$ -Ammoniak zugesetzt, daß sie eine schwache, aber deutliche alkalische Reaktion Lackmuspapier gegenüber bekommt, und nun weiter während etwa einer Woche gegen ausgekochtes Wasser dialysiert. Um eine Verdünnung der Eieralbuminlösung während der Dialyse zu vermeiden, wird dieselbe in einem Apparat vorgenommen, welcher es erlaubt, die «Außenflüssigkeit» (das Wasser) unter einen solchen Minderdruck zu stellen, daß der osmotische Druck der «Innenflüssigkeit» (der Albuminlösung) dadurch ausgeglichen wird. Die Behandlung mit $\frac{n}{1}$ -Ammoniak wird zum zweiten und, wenn nötig, zum dritten Male wiederholt, indem die Schwefelsäure erst dann als vollständig beseitigt betrachtet wird, wenn durch die unten beschriebene Probe (siehe S. 39) weder im letzten Dialysat vor dem Zusatz des Ammoniaks noch im ersten Dialysat nach demselben Schwefelsäure nachzuweisen ist (vgl. S. 41). Nach dem letzten Ammoniakzusatz wird noch eine Woche gegen ausgekochtes Wasser dialysiert, und dann wird die Eieralbuminlösung filtriert und analysiert. Durch diese Analyse wird der Gehalt an Proteinstickstoff und an Ammoniakstickstoff ermittelt. Wird nun eine mit dem gefundenen Ammoniak äquivalente Menge Schwefelsäure (oder einer anderen Säure) zugesetzt, dann hat man eine wohl definierte Eieralbuminlösung, deren Konzentration an Proteinstickstoff bekannt ist, und die außer dem Eieralbumin nur eine geringfügige und bekannte Menge Ammoniumsulfates (oder eines anderen Ammoniumsulfates), aber weder Ammoniak noch

Schwefelsäure im Überschuß enthält. Aus einer solchen Lösung können natürlich durch Zusatz passender Mengen von Säuren, Salzen oder Ammoniak Eieralbuminlösungen der verschiedenartigsten, aber doch völlig bekannten Gesamtzusammensetzung hergestellt werden. Die Verteilung der solchermaßen zugesetzten Stoffe unter den beiden Phasen der Albuminlösung aber ist eine ganz andere Frage, womit wir uns an dieser Stelle gar nicht beschäftigen wollen (siehe darüber die Abhandlung II und V).

a) Der Dialyseapparat.

Die in Figur 1 abgebildete Dialysierzelle ist der wesentliche Teil des Dialysierapparates. Die Zelle besteht aus einer

mit zwei Tubus (A und B) versehenen Flasche, in deren zugeschliffenen Hals (C) ein hohler, oben trichterförmiger Stöpsel (D) genau einpaßt. Der Stöpsel trägt oben als Deckel eine kleine Glasglocke und an seinem unteren schwach konischen Teil ein wie ein Reagierglas geförmtes Kollodiumhäutchen (E), dessen Darstellung unten beschrieben wird. Wenn der Schliff gut ist und das Häutchen am Stöpsel paßt, dann kann man mittels eines schwachen Druckes gegen den Stöpsel — und wenn nötig durch Dich-



tung mit etwas reinem Vaseline — einen vollständig luftdichten Verschuß aufbringen.

Fig. 1.

Beim Gebrauch der Zelle wird die zu dialysierende, mit einem reichlichen Überschuß an Toluol gut vermischte Eieralbuminlösung durch den Trichter ins Häutchen gegossen, während ausgekochtes destilliertes Wasser durch B zugeleitet wird, wonach die Zelle in den gesamten Dialysierapparat eingeschaltet wird.

Dieses letztere, von welchem Figur 2 eine schematische Darstellung gibt, besteht aus 6 Zellen, die nebeneinander in einem

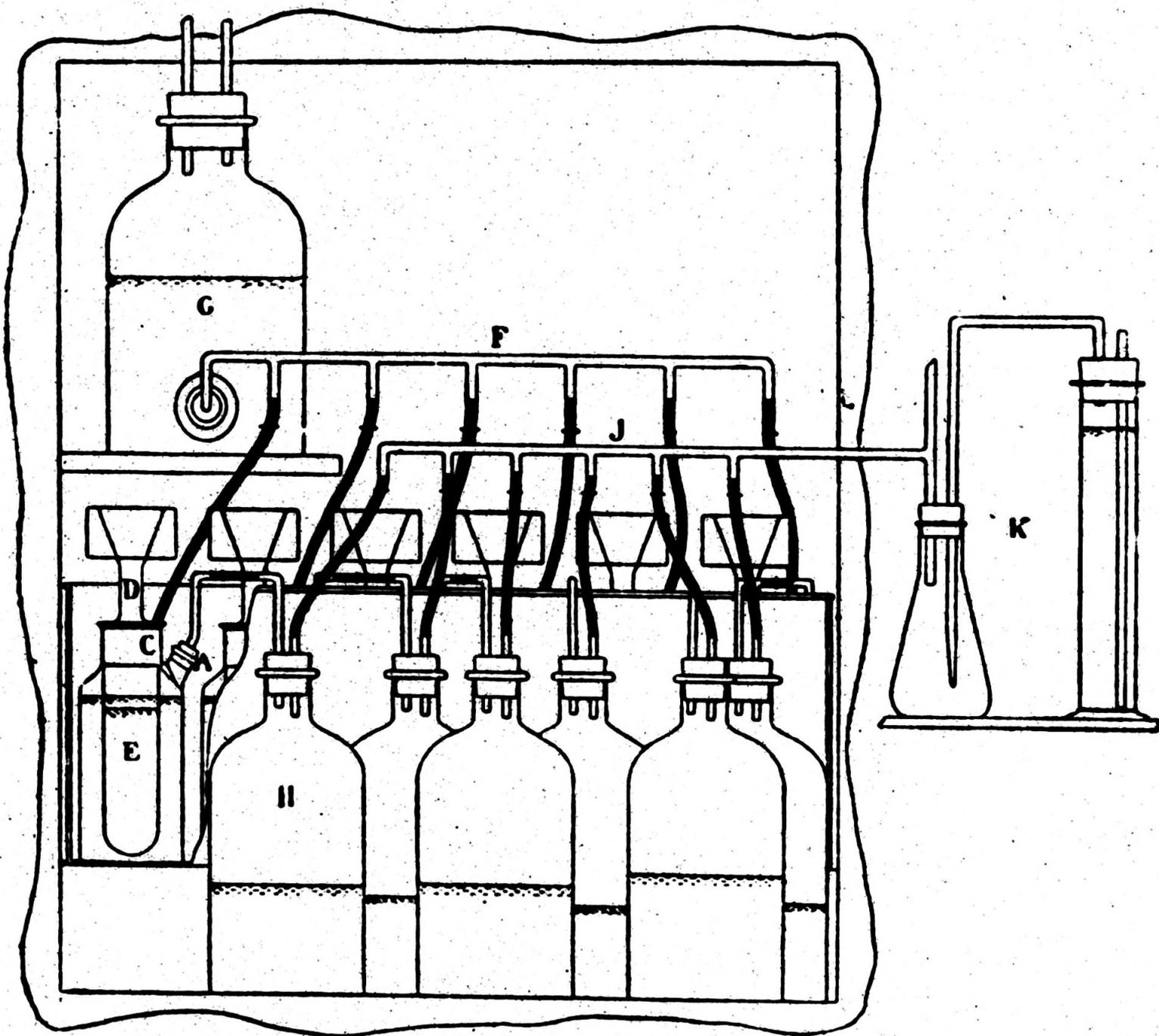


Fig. 2.

mit zerquetschtem Eisen gefüllten Zinkkasten angebracht sind, der seinerseits im Eisschrank steht. Der Tubus B jeder der 6 Zellen ist mittels eines mit einem Quetschhahn versehenen Kautschukschlauchs mit dem Glasrohr F verbunden, welches an den Behälter G führt; dieser Behälter ist im Eisschrank angebracht und dient zur Aufbewahrung und Kühlung des zur Erneuerung der Außenflüssigkeit bestimmten ausgekochten

Wassers. G kann mittels Rohrleitungen, die durch die Decke des Eisschranks führen, aus einem oben auf demselben gestellten Behälter gefüllt werden. Vom Tubus A führt ein mit Quetschhahn versehener Kautschukschlauch an die Flasche H, welche zum Aufsammeln der benutzten Außenflüssigkeit dient. Jede Zelle hat ihre eigene Sammelflasche, und diese 6 Flaschen sind durch Kautschukschläuche, die mit Quetschhähnen versehen sind, mit dem gemeinsamen Rohr J verbunden, welches seinerseits durch ein T-Rohr außerhalb des Eisschranks teils zum Druckregulator K führt und teils zu einer an der Figur nicht gezeichneten Wasserstrahlpumpe mit angehörigem Manometer.

Beim Anfang der Dialyse, nachdem die Zellen, wie oben beschrieben, gefüllt und an den Platz gebracht sind, wird die Saugpumpe in Gang gesetzt, indem nur die Quetschhähne zwischen der Leitung J und den Flaschen H offen sind. Wenn der Druck nach einiger Zeit so weit gefallen ist, daß der Regulator, welcher gewöhnlich auf einem Unterdruck von 24 bis 25 cm Quecksilber eingestellt ist, in Funktion tritt, dann öffnet man vorsichtig die Quetschhähne zwischen den Flaschen H und den Zellen, damit die Außenflüssigkeit auch unter den Minderdruck kommt, wodurch der osmotische Druck der Innenflüssigkeit kompensiert wird. Der Apparat kann jetzt sich selbst überlassen werden, nur muß die Außenflüssigkeit zu angemessenen Zeitpunkten gewechselt werden, was man einfach dadurch bewerkstelligt, daß man den Quetschhahn zwischen der Leitung F und der betreffenden Zelle vorsichtig öffnet. Des vorhandenen Unterdrucks wegen wird dann die Außenflüssigkeit aus der Zelle in H hinüber gesaugt und durch frisches Wasser aus dem Behälter G ersetzt werden. G ist mit einer Einteilung versehen, wodurch man die Menge des zugelaufenen Wassers beobachten kann. Wenn die Flaschen H entleert werden sollen, werden diejenigen Quetschhähne, welche sie von den Zellen scheiden, geschlossen, wodurch der Unterdruck in den Zellen erhalten wird, und die Quetschhähne werden erst dann wieder geöffnet, wenn in den entleerten Flaschen H der Unterdruck wieder hergestellt ist.

Die Größenverhältnisse betreffend, haben wir die folgenden Dimensionen benutzt: Jedes Kollodiumhäutchen hält 200 ccm, jede Zelle 600—700 ccm Außenflüssigkeit, H faßt 4 Liter und G 7 Liter. Die Außenflüssigkeit wird in 24 Stunden 3mal gewechselt, und bei jedem Wechsel läuft 1 l Wasser durch jede Zelle.

Darstellung der Kollodiumhäutchen.

Das von uns für die Darstellung der Kollodiumhäutchen angewandte Verfahren weicht von den schon bekannten Methoden zur Darstellung von Kollodiummembranen in einzelnen Punkten ab;¹⁾ es ist im wesentlichen von Herrn J. A. Christiansen ausgearbeitet worden.

Für die Darstellung sind nur bestimmte für diesen Zweck dargestellte Kollodiumsorten zu gebrauchen. Früher ist das von C. A. F. Kahlbaum bezogene «Kollodium zur Herstellung von Membranen für Dialyse» brauchbar gewesen, seit etwa einem Jahr aber ist auch diese Ware nicht zufriedenstellend. Wir haben sie dann gereinigt, indem wir sie durch Papier filtrierten, in einer großen Schale mittels eines Heißluftgebläses einengten, bis der Äther und der größte Teil des Alkohols verdampft waren, und schließlich den Rückstand mit mehrere Male gewechseltem destilliertem Wasser sorgfältig durchkneteten. Nach Stehenlassen mit Wasser bis zum nächsten Tag wurde die ausgeschiedene Kollodiumbaumwolle abfiltriert, in der Luft vorgetrocknet und schließlich, in Filtrierpapier eingewickelt, mittels des Heißluftgebläses bis zu konstantem Gewicht getrocknet. Etwa 30 g der vollständig trocknen Kollodiumwolle wurden durch wiederholtes Schütteln im Laufe einiger Tage in einer Mischung von 750 ccm absolutem Alkohol und 250 ccm wasserfreiem Äther gelöst. Die solcherweise erhaltene Lösung ist immer ausgezeichnet brauchbar gewesen, während ätherreichere Lösungen bisweilen Schwierigkeiten gebracht haben, und zwar wahrscheinlich deshalb, weil die Verdampfung des Äthers während der Darstellung des Häutchens so lebhaft gewesen ist, daß sich Wasser durch die Abkühlung an das

¹⁾ Die frühere Literatur betreffend wird z. B. auf Wo. Ostwald, Grundriß der Kolloidchemie, zweite Aufl., 1911, S. 12 verwiesen.

Häutchen verdichtet, was demselben ein fahles Aussehen verleiht und bewirkt, daß seine Durchlässigkeit zu groß wird.

Als Unterlage bei der Darstellung der Häutchen dient ein auswendig mittels Seife gewaschenes und nachher gut abgetrocknetes dickwandiges Reagenzglas, welches im Boden ein kleines Loch (etwa 2 mm im Diameter) hat.¹⁾ Dieses Reagenzglas wird an einen Korkpropfen angebracht (aber nicht luftdicht), welches wieder an einer wagerechten Achse sitzt, die durch einen Motor in langsame Rotation (40—60 Umdrehungen pro Minute) versetzt werden kann. Die Lage dieser Achse ist derart in einem Gestell festgespannt, daß die Achse aus der wagerechten Stellung hinausgedreht werden kann.

Der erste Schritt der Darstellung besteht darin, daß man Kollodium auf das untere Ende des schwach geneigten (20 bis 30°) rotierenden Reagenzglases gießt, um dadurch einerseits das Loch im Boden zu verschließen und andererseits den untersten Teil des Häutchens zu verstärken. Einige Sekunden nach dem Aufgießen wird die Rotation einen Augenblick eingestellt, damit der Überschuß an Kollodium abtropfen kann; er wird in einer untergestellten mit einem Trichter versehenen Flasche aufgefangen. Nach 6 bis 8 Minuten Rotation wird das erste eigentliche Aufgießen vorgenommen, während dessen die Achse mit dem Reagierglas rotiert und in schwach geneigter Stellung steht. Man gießt das Kollodium in einem dünnen Strahl vom oberen bis zum unteren Teil des Glases auf und bricht dann das Umdrehen einige Sekunden ab, um dem Überschuß des Kollodiums die zum Abtropfen nötige Zeit zu lassen. Dann wird die Achse in wagerechte Stellung gebracht und die Rotation 6 bis 8 Minuten fortgesetzt, wonach das Aufgießen wie das erste Mal wiederholt wird.

Wir haben für gewöhnlich in dieser Weise 4 mal aufgegossen, und außerdem, um den oberen Saum des Häutchens

¹⁾ Die Weite des Reagenzglases darf unter keinen Umständen unten größer als oben sein und muß der Größe des Stöpsels D (siehe Fig. 1) in der Weise genau angemessen sein, daß sie so weit als möglich dem Durchmesser des Stöpsels mitten am Schiffe gleich ist; gewöhnlich gebrauchen wir Reagenzgläser der Größe 240 × 44 mm.

zu verstärken, diesem einen Extra-Aufguß, während das Glas in wagerechter Stellung rotierte, gegeben. Nach dem letzten Aufgießen wird das Häutchen $1\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden an der Luft getrocknet, und zwar so, daß das Umdrehen in wagerechter Stellung jedenfalls während der ersten halben Stunde fortgesetzt wird. Mittels eines scharfen Messers wird nun oben am Glas und ganz herum ein Ritz ins Kollodium geschnitten, das Glas mit Wasser gefüllt und das Ganze in Wasser gestellt, wodurch der nach dem Lufttrocknen noch im Häutchen zurückgebliebene Alkohol herausdiffundiert und durch Wasser ersetzt wird. Nach einigen Stunden kann man jetzt eine Luftblase unter den oberen Rand des Häutchens zwischen dieses und das Glas hineinbringen und durch vorsichtiges Reiben, am besten unter ununterbrochenem Zutropfen von Wasser, in eine Spirale bis zum Boden des Glases herunterführen, und dadurch das Häutchen derart losmachen, daß es sich abziehen läßt, indem Wasser durchs Loch im Boden des Glases hineintritt und den Zwischenraum zwischen Glas und Häutchen ausfüllt.

Das Häutchen ist jetzt gebrauchsfertig, es kann aber, ohne seine Durchlässigkeit merklich zu ändern, in (toluolgesättigtem) Wasser oder in einer Salzlösung in unbegrenzter Zeit aufbewahrt werden; trocken darf es aber niemals werden, weil die Durchlässigkeit dadurch im wesentlichen verloren geht.

Wenn das Häutchen in die Dialysierzelle auf den Stöpsel D (Fig. 1) eingesetzt werden soll, wird es erst vorsichtig in der Mündung erweitert — wie man den Finger eines Handschuhes erweitert — entweder mittels des Fingers oder besser mittels einer angemessenen Lehre, und dann an den untersten geschliffenen Teil des Stöpsels hineingeschoben. Hat man das Häutchen erst ein paar Millimeter auf den Schliff hineingebracht, dann hält man das Ganze derart unter einem tröpfelnden Wasserhahn, der es befeuchtet, daß das Häutchen nach vorn und nach unten zeigt, und jetzt zieht man das Häutchen an sich durch Reibung mit dem Daumen, indem man für jeden «Griff» das Ganze ein wenig dreht. In dieser Weise läßt sich das Häutchen nach und nach 1 bis 2 Zentimeter über den unteren Rand des Schliffes heraufziehen; das Anbringen des

Häutchen ist aber eine etwas heikle Operation, die außer Vorsicht und Übung seitens des Arbeitenden noch verlangt, daß die Qualität des Häutchens gut ist, weil es sonst birst.

Ist das Häutchen jetzt aufgesetzt, hat man es nebst dem Stöpsel mit Wasser zu füllen, und an seinen Platz in der Zelle einzusetzen,¹⁾ um demnächst, bevor man es in Gebrauch nimmt, zu untersuchen, einerseits ob der Apparat dicht und das Häutchen stark genug ist, und andererseits wie weit die Durchlässigkeit des Häutchens eine angemessene ist. Das erste prüft man einfach dadurch, daß man die Zelle außerhalb und innerhalb des Häutchens mit Wasser anfüllt, das Rohr durch den Tubus A (Fig. 1) schließt und dann vorsichtig und nach und nach durch den Tubus B einen etwas größeren Unterdruck wirken läßt, als derjenige, bei welchem der Apparat später zu gebrauchen ist. Ist der Apparat undicht, sodaß sich Luft am Stöpsel D hineinsaugt, dann kann diesem Fehler gewöhnlich durch Dichtung mittels etwas Vaseline abgeholfen werden; ist das Häutchen derart undicht, daß sowohl Wasser als Luft sich durchsaugen lassen, dann ist es wegzuwerfen; ist es zu schwach, zerspringt es während der Probe.

Die Durchlässigkeit des Häutchens hängt teils von seiner Wandstärke, teils von der Trocknungszeit zwischen den einzelnen Begießungen bei der Darstellung, besonders aber von der Zeit zwischen der letzten Begießung und der Anbringung in Wasser ab, und sie ist um so geringer, je länger die Trockenzeit gewesen ist.

Die Probe ist die folgende:

Die Zelle wird mit einer ammoniumsulfathaltigen Eieralbuminlösung als Innenflüssigkeit und reinem Wasser als Außenflüssigkeit beschickt und sodann während 24 Stunden bei dem-

¹⁾ Dieses läßt sich bisweilen ohne Schwierigkeit bewerkstelligen, gewöhnlich ist aber der Durchmesser des Häutchens so groß, daß das folgende Verfahren eingeschlagen werden muß: Wie oben wird das Häutchen mit Wasser gefüllt und dessen unteres Ende in die Öffnung der Zelle angebracht. Indem man das Häutchen mit der linken Hand stützt, hebt man das Ganze ein wenig vom Tisch, worauf es steht, und läßt es dann fallen. Nach einigen Malen Wiederholung sinkt das wassergefüllte Häutchen wegen seines Gewichts an seinen Platz hinunter.

jenigen Minderdruck, welcher später zu gebrauchen ist, hingestellt.

Am nächsten Tage wird die Außenflüssigkeit mit reinem Wasser gewechselt, was die zwei nachfolgenden Tage wiederholt wird, die 3 Dialysate werden jedes für sich analysiert, und die Durchlässigkeit des Häutchens wird für passend erachtet, wenn das Ammoniumsulfat so leicht durchgegangen ist, daß im dritten Dialysat nur verhältnismäßig wenig Schwefelsäure nachzuweisen ist, und das Eieralbumin sich höchstens in Spuren in den Dialysaten vorfindet. Die Prüfung auf Eieralbumin macht man in 100 ccm des Dialysats durch Zufügung von 10 ccm $n/1$ -Essigsäure und 10 ccm $n/1$ -Natriumacetat mit nachfolgendem halbstündigem Erhitzen auf dem Wasserbade. Entsteht mehr als ein ganz unbedeutender Niederschlag bei dieser Behandlung, ist das Häutchen zu verwerfen. Die Probe ist sehr fein, indem Kontrollversuche gezeigt haben, daß selbst so kleine Eieralbuminmengen, wie diejenigen, die 0,1 bis 0,2 mg Proteinstickstoff entsprechen, in dieser Weise eine schwache Opalescenz und einen bleibenden Schaum geben. Es kommt bisweilen vor, daß ein Häutchen in den ersten 24 Stunden ein wenig Albumin durchgehen läßt, aber diese Durchlässigkeit während der Probe verloren geht; ein solches Häutchen ist natürlich vollends brauchbar. Ist eine Dialysierzelle einmal probiert und in Ordnung, dann kann sie jahrelang gebraucht werden, nur muß man dafür Sorge tragen, daß sie nach jedem Gebrauch gut gereinigt wird, daß sie nie trocken wird, und daß sie, um steril zu bleiben, in toluolgesättigtem Wasser oder gesättigter Ammoniumsulfatlösung und damit gefüllt aufbewahrt wird.

Der oben beschriebene Dialysierapparat kann mit Vorteil Verwendung finden, nicht nur für die hier erwähnten Versuche, sondern auch bei jeder Dialyse, bei welcher eine zu starke Verdünnung der zu dialysierenden Flüssigkeit unerwünscht ist. Da es ein Leichtes ist, durch ein abgeändertes Darstellungsverfahren den Häutchen eine abgeänderte Durchlässigkeit zu

erteilen, so wird es möglich sein, den Apparat bei der Dialyse der verschiedenartigsten Lösungen zu verwenden, indem man die Durchlässigkeit nach den jedesmal gestellten Forderungen abmißt. So haben wir ihn zur Reinigung einer Reihe Enzymlösungen benutzt, wodurch wir nicht nur das Wegschaffen der Salze, Aminosäuren usw., sondern auch eine bedeutende Konzentrierung der Enzymlösungen erreicht haben.

b) Prüfung auf Schwefelsäure.

Prüfung im Dialysat. Zu 1 l Dialysat wird 2 ccm $n/1$ -Natriumacetatlösung und 2 ccm $n/1$ -Essigsäure zugesetzt, worauf im Vakuum in einem wohlgereinigten Kolben, der mit einem ausgekochten Korkpropf und gutgereinigten Glasröhren montiert ist, eingedampft wird. Die während des Einengens durch das Kapillarrohr eintretende Luft passiert zuerst eine kleine Waschflasche mit Natriumhydroxydlösung, um von schwefliger Säure befreit zu werden. Nach Einengung bis auf einige wenige Kubikzentimeter wird durch ein kleines, gut ausgewaschenes Filter in einem Reagenzglas filtriert und der Kolben und das Filter mit reinem Wasser gewaschen, sodaß das gesamte Volumen des Filtrats etwa 15 ccm beträgt. Hierzu wird unter gutem Schütteln 5 Tropfen 2 n-Baryumchloridlösung gegeben, und die dadurch eventuell entstehende Trübung mit der Trübung einer Reihe gleichzeitig zubereiteter Kontrollösungen verglichen. Jede Kontrollösung enthält 2 ccm $n/1$ -Natriumacetatlösung + 2 ccm Essigsäure + a ccm $n/100$ -Schwefelsäure + $(11 \div a)$ ccm Wasser nebst 5 Tropfen Baryumchloridlösung; a variiert von 0 bis 2.

Prüfung in der Eieralbuminlösung. 50 ccm Eieralbuminlösung werden mit 200—300 ccm Wasser vermischt und unter gutem Schütteln mit 2 ccm $n/1$ -Natriumhydroxydlösung versetzt. Nach Stehenlassen $1/2$ Stunde bei Zimmertemperatur wird 4 ccm $n/1$ -Essigsäure zugegeben und dann unter gutem und wiederholtem Schütteln durch Erhitzung auf siedendem Wasserbade in $3/4$ Stunde das Albumin zum Koagulieren gebracht. Der Niederschlag wird auf einem gut gewaschenen Filter abfiltriert und einige Male mit Wasser gewaschen, wonach Filtrat

und Waschwasser im Vakuum eingedampft und ganz wie oben behandelt wird.

Kontrollversuche, die teils an reinem Wasser und teils an einer Eieralbuminlösung, die durch langdauernde Dialyse, während welcher Ammoniak mehrere Male zugegeben wurde, vollständig von Schwefelsäure befreit war, ausgeführt waren, haben uns gezeigt, daß die Grenze der Empfindlichkeit des hier beschriebenen Verfahrens bei 0,2 bis 0,3 ccm $n/100$ -Schwefelsäure liegt, indem kleinere Schwefelsäuremengen nicht mit Sicherheit nachzuweisen sind. Weiter haben wir gefunden, daß die (quantitative) Schätzung der vorhandenen Menge Schwefelsäure mittels des oben beschriebenen Vergleichs zwischen der zu untersuchenden Probe und den Kontrolllösungen von bekanntem Säuregehalt sich bei Mengen von 0,2 bis 2 ccm $n/100$ -Schwefelsäure einigermaßen genau gestaltet, während Mengen von 2—4 ccm den Vergleich unsicherer und größere Mengen ihn beinahe unmöglich machen.

Diese Kontrollversuche erlauben uns den Schluß zu ziehen, daß Dialysate oder Eieralbuminlösungen, die bei der Schwefelsäureprobe eine klare Lösung geben oder eine Unklarheit zeigen, die kleiner ist als diejenige einer Kontrollösung mit 0,3 ccm $n/100$ -Schwefelsäure, entweder schwefelsäurefrei sind oder jedenfalls in der zur Probe verwendeten Menge höchstens 0,3 ccm $n/100$ -Schwefelsäure enthalten.

c) Verlauf der Dialyse.

Zum besseren Verständnis des Dialysierprozesses sollen die Einzelheiten eines der Versuche, dessen ganzer Verlauf durch quantitative Bestimmungen in den Dialysaten verfolgt wurde, hier angeführt werden.

610 g toluolhaltige Eieralbuminlösung mit einer 12,6 g Proteinstickstoff entsprechenden Menge Eieralbumin und einem 16,204 g Ammoniakstickstoff entsprechenden Gehalt an Ammoniumsulfat wurden am 11./9. 1914 in die 6 Zellen des Apparates verteilt, wodurch die Häutchen halb voll wurden. Die Oberflächen der Innenflüssigkeit wurden mit Toluol überschichtet. Das gesammelte erste Dialysat, d. h. die Dialysate von den

ersten 3 Auswechslungen (11./9.—12./9.) wog 19 130 g. Der Ammoniakgehalt wurde so genau wie möglich in 3 abgewogenen Proben jede von 30 g bestimmt; das gesamte Dialysat enthielt 14,912 g Ammoniakstickstoff oder 92,03% der ganzen Menge. Das zweite, dritte und vierte Dialysat wurden in derselben Weise behandelt; die folgenden Dialysate wurden gemessen, und das Ammoniak aus aliquoten Teilen abdestilliert und nach Neßler bestimmt (siehe S. 65); das Resultat war folgendes:

| | | Gewicht oder Volumen des Dialysats | Gehalt an Ammoniak- stickstoff | |
|--------------|------------------------------|--|-----------------------------------|--|
| | | | in g | in % d. Ges- ammoniak- stickstoffs |
| Erstes | Dialysat (11./9.—12./9.) . . | 19130 g | 14,912 | 92,03 |
| Zweites | › (12./9.—13./9.) . . | 17370 › | 1,015 | 6,26 |
| Drittes | › (13./9.—14./9.) . . | 17850 › | 0,137 | 0,85 |
| Viertes | › (14./9.—15./9.) . . | 17700 › | 0,044 | 0,27 |
| Fünftes | › (15./9.—16./9.) . . | 17730 ccm | 0,0226 | 0,14 |
| Sechstes | › (16./9.—17./9.) . . | 17770 › | 0,0111 | 0,07 |
| Siebentes | › (17./9.—18./9.) . . | 18140 › | 0,0096 | 0,06 |
| Achtes | › (18./9.—19./9.) . . | 16220 › | 0,0050 | 0,03 |
| Zusammen . . | | | 16,1563 | 99,71 |

Im achten Dialysat wurde außerdem der Schwefelsäuregehalt bestimmt, und es wurde gefunden, daß 1 l Dialysat 1,2 ccm $n/100$ -Schwefelsäure enthielt.

Am 19./9. nahmen wir den Apparat auseinander, indem der Unterdruck in den Zellen beibehalten wurde, entleerten den Inhalt der Zellen mittels eines als Heber wirkenden gut ausgekochten Kautschukschlauchs in eine Flasche und gaben ihm demnächst nach und nach unter gutem Schütteln so viel Ammoniak zu, daß die Reaktion der Flüssigkeit gegen Lackmuspapier schwach, aber deutlich alkalisch wurde (23,2 ccm $n/1$ -Ammoniak war notwendig). Nach erneutem Schütteln wurde die Eieralbuminlösung wieder in die Häutchen gebracht, der Trichter mit ein wenig ausgekochtem Wasser gespült, ein wenig Toluol zugegeben, und die Dialyse fortgesetzt.

Im folgenden (neunten) Dialysat wurde nicht nur — was zu erwarten war — mehr Ammoniak als im achten gefunden, sondern auch mehr Schwefelsäure, und zwar im ganzen 0,0154 g Ammoniakstickstoff und in 1 l etwa 6 ccm $n/_{100}$ -Schwefelsäure; schon im nächstfolgenden (zehnten) Dialysat aber fanden sich nur im ganzen 0,0066 g Ammoniakstickstoff und in 1 l 0,6 ccm $n/_{100}$ -Schwefelsäure.

Die Dialyse wurde jetzt bis zum 30./9. fortgesetzt und während dieser Zeit nahm der Gehalt des Dialysats an Ammoniak ganz langsam von 0,0066 bis zu 0,0041 g Ammoniakstickstoff ab. Schwefelsäure war nur in den Dialysaten der ersten Tage nachweisbar, in denjenigen der späteren dagegen nicht.

Am 30./9. wurde der Apparat wieder auseinander genommen, Ammoniak wie oben zugegeben, bis die Eieralbuminlösung schwach, aber deutlich alkalisch gegen Lackmuspapier reagierte (gebraucht 5 ccm $n/_{1}$ -Ammoniak) und die Dialyse wieder bis zum 7./10. fortgesetzt. Der Gehalt an Ammoniakstickstoff der Dialysate dieser Periode fiel gleichmäßig von 0,0126 g bis 0,0052 g. 1 l des Dialysates des ersten Tages (30./9.—1./10.) enthielt 0,4 ccm $n/_{100}$ -Schwefelsäure, in den späteren Dialysen war Schwefelsäure nicht nachzuweisen.

Die Dialyse wurde am 7./10. abgebrochen und die Häutchen wurden entleert; trotz dem angewandten Minderdruck (25 cm Quecksilber) hatte das Volumen der Eieralbuminlösung sich bedeutend vergrößert, indem die Innenflüssigkeiten die Häutchen füllten und in die Trichter hinauf standen; das Gesamtvolumen betrug etwas mehr als 1400 ccm. In 50 ccm der Eieralbuminlösung war Schwefelsäure nicht nachzuweisen. 100 ccm der Lösung enthielten 837,6 mg Proteinstickstoff und 23,0 mg Ammoniakstickstoff.

Aus diesem typischen Beispiel des Verlaufes einer Dialyse ist erstens zu ersehen, daß weitaus der wesentlichste Teil des Ammoniumsulfats sehr schnell hinausdialysiert, zweitens aber auch, daß es sehr schwierig, wahrscheinlich sogar unmöglich sein wird, die letzten Spuren der beiden Bestandteile zu entfernen, selbst durch langwierige Dialyse. Es ist ebenfalls

zu ersehen, daß die Zufügung des Ammoniaks zu der Eieralbuminlösung die Schwefelsäuremenge im Dialysate vergrößert (die ersten Ammoniakzugaben von 1,2 bis 6 ccm $n/_{100}$ -Schwefelsäure, die letztere von 0 bis 0,4 ccm). Da ein Ammoniakzusatz den osmotischen Druck der Albuminlösung bedeutend vergrößert, so ist ein Minderdruck von 25 cm Quecksilber nicht groß genug, um eine Verdünnung der Innenflüssigkeit völlig zu hindern. Diesem Mangel kann indessen zum Teil dadurch abgeholfen werden, daß die Dialyse noch länger als in dem oben beschriebenen Beispiel fortgesetzt wird, indem das Ammoniak nach und nach, aber in allmählich abnehmenden Mengen wegdialysiert, was den osmotischen Druck der Eieralbuminlösung verringert, so daß eine entsprechende Wegsaugung von Wasser vor sich geht; um das zu erreichen, muß man aber noch Wochen hindurch die Dialyse fortsetzen.

d) Wird das Eieralbumin während der Dialyse verändert?

Unter den Faktoren, welche gewöhnlich und mit Recht als von Bedeutung für die Eigenschaften einer kolloiden Lösung genannt werden, sind das Alter und die Vorgeschichte derselben. Da es unmittelbar einleuchtend ist, daß Untersuchungen wie diejenigen, von welchen in dieser und den folgenden Abhandlungen die Rede sein wird, nur von wenig Nutzen sein würden, falls die Eigenschaften des Ausgangsmaterials, der Eieralbuminlösung, sich während der Aufbewahrung änderten, so haben wir immer gesucht soweit als möglich darzutun, daß unsere Eieralbuminlösungen keinerlei Veränderungen leiden, wenn sie mit der notwendigen Sorgfalt aufbewahrt und behandelt werden. Wir haben dann gefunden, daß die wichtigste Quelle der Umwandlungen von Eieralbuminlösungen in der Wirksamkeit der Mikroorganismen zu suchen ist. Verhindert man diese Wirksamkeit durch reichliche Anwendung von Toluol, oft wiederholtes Umschütteln und Aufbewahrung der Lösungen in Eis in einem Eisschrank, dann ist es möglich, die ursprünglichen und für das betreffende Albumin charakteristischen Eigenschaften einer Eieralbumin-

lösung unverändert nach Monaten zu bewahren. Auch während der Dialyse verändert sich das Eieralbumin nicht, sofern die obengenannten Vorsichtsmaßregeln beobachtet werden. Dieses zeigt sich am deutlichsten — wie es in der Abhandlung V des näheren erörtert wird — dadurch, daß der osmotische Druck einer dialysierten und nachher mit Ammoniumsulfat versetzten Eieralbuminlösung und der einer nicht dialysierten mit demselben Ammoniumsulfatgehalt unter übrigens denselben Umständen ganz derselbe ist. Und eben durch die Messung des osmotischen Druckes ist eine angefangene, ganz geringfügige Spaltung scharf und sicher nachzuweisen.

Wir haben auch untersucht, ob eine der charakteristischen Eigenschaften einer Eieralbuminlösung, und zwar die Fähigkeit, sich durch Zugabe von Ammoniumsulfat krystallinisch auszuscheiden, während der Dialyse verändert wird. Es hat sich dabei herausgestellt, daß eine in normaler Weise dialysierte Eieralbuminlösung durch Zusatz von etwas Ammoniumsulfat und ein wenig Impfmateriale sehr nahe eben so vollständig wie eine nicht dialysierte auskrystallisiert. Nicht krystallisierbares Albumin ist somit während der Dialyse nicht in nennenswerten Mengen gebildet worden. Auf der anderen Seite, wenn es sich ereignet, daß eine Eieralbuminlösung wegen wenig sorgfältiger Behandlung, z. B. Stehenlassen während einiger Tage bei Zimmertemperatur ohne wesentlichen Gehalt an Ammoniumsulfat oder an Toluol, durch Fäulnisbakterien angegriffen wird, was sich immer nach Austreibung des Toluols mittels eines Wasserstoffstroms durch den Geruch verrät, dann wird ein wesentlicher Teil des krystallisierbaren Albumins in nicht krystallisierbares umgewandelt worden sein, auch wenn die Spaltung nur so weit vorgeschritten ist, daß nicht mehr als ganz unbedeutende Mengen des Proteinstoffs in nicht koagulierbare Körper verwandelt worden sind. Die Umbildung des krystallisierbaren in nicht krystallisierbares Albumin scheint demnach das erste Stadium des Abbaus desselben zu repräsentieren.¹⁾

¹⁾ Es würde somit naheliegend sein, das Konalbumin des natürlichen Eiweißes als ein Abbauprodukt des krystallisierbaren Eieralbumins, das öfters «Ovalbumin» genannt wird, zu betrachten. Daß frischgelegte

Schließlich führen wir ein paar Versuche zur näheren Beleuchtung des hier Erwähnten an:

120 ccm einer dialysierten, vom Überschuss an Toluol abfiltrierten, aber noch stark nach Toluol riechenden Eieralbuminlösung mit im ganzen 4,1752 g Proteinstickstoff wurden mit 66,5 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung und 5 Tropfen Impfmateriale versetzt. Die Krystallisation verlief in normaler Weise, und die Krystalle zeigten unter dem Mikroskop das gewöhnliche Aussehen. Nach Stehenlassen bei Zimmertemperatur während 8 Tage unter gutem Umschütteln wurde filtriert und das Filtrat analysiert. Es hatte eine dem $p_{\text{H}} = 4,86$ entsprechende Wasserstoffionenkonzentration und enthielt per 100 g Wasser 0,667 g Eihydrat und 27,122 g Ammoniumsulfat.

Mittels der in der Abhandlung IV mitgeteilten Untersuchungen läßt sich nun schätzen (vgl. früher S. 26), daß ein Filtrat, welches von einer 8tägigen Krystallisation herrührt, eine dem $p_{\text{H}} = 4,86$ entsprechende Wasserstoffionenkonzentration hat und per 100 g Wasser 27,122 g Ammoniumsulfat enthält, etwa 0,570 g krystallisierbares Eihydrat auf 100 g Wasser enthalten muß.

Der Unterschied zwischen dem solcherweise eingeschätzten und dem gefundenen Gehalt an Eihydrat beträgt nur 0,097 g und mag, wenigstens zum Teil, von Unterschiedlichkeiten in den Krystallisationsbedingungen und damit in der Krystallisationsgeschwindigkeit herrühren. Gesetzt aber, daß der ganze Unterschied auf die Bildung nichtkrystallisierbaren Albumins beruht, ergibt eine einfache Rechnung, daß die Menge von diesem nur etwa $\frac{1}{2}\%$ der ganzen ursprünglich in Lösung anwesenden Menge Eieralbumins ausmacht. Wir glauben uns deshalb berechtigt zu sagen, daß die Menge des während der Dialyse gebildeten Eieralbumins ganz belanglos ist.

Vollständigkeitshalber soll zugefügt werden, daß nicht koagulierbare Proteinstoffe im Filtrat nicht nachgewiesen werden konnten, und daß die ursprüngliche Lösung nach Austreibung des Toluols durch Wasserstoffdurchleitung ganz geruchlos war.

Ganz anders stellte sich die Sache mit einer anderen Probe dialysierter Eieralbuminlösung, welche nach Austreibung des Toluols einen deutlichen, wenn auch sehr schwachen faulen Geruch hatte. In einem Krystallisationsversuch, ähnlich dem oben beschriebenen, wurde gefunden, daß diese Lösung nach 14 Tagen Stehenlassen bei Zimmertemperatur ein Filtrat gab, dessen Wasserstoffionenkonzentration dem $p_{\text{H}} = 4,99$ entsprach und welches auf 100 g Wasser 1,539 g Eihydrat und 30,859 g Ammoniumsulfat enthielt.

Eier eine bessere Ausbeute an krystallisiertem Eieralbumin geben als solche, die längere Zeit hindurch aufbewahrt gewesen, würde damit auch in gutem Einklang stehen.

Da nun die Schätzung ergab, daß ein solches Filtrat auf 100 g Wasser etwa 0,140 g krystallisierbares Eihydrat enthalten mußte, so war demnach die Menge von nicht krystallisierbarem Albumin auf 100 g Wasser hier ungefähr 1,453 g. Daraus ließ sich leicht berechnen, daß in diesem Falle sich gegen 27% der ganzen ursprünglichen Proteinmenge in nicht krystallisierbares Albumin umgewandelt hatte.

Des weiteren enthielt das Filtrat nicht koagulierbare Protein-
stoffe in einer Menge, die 2,7 mg Stickstoff per 100 g Wasser entsprach, also zwar nicht große, aber doch sicher nachweisbare Quantitäten.

Noch soll hier zugefügt werden, daß wir auf die in der Abhandlung II beschriebene Weise einige Bestimmungen der Säurebindungs-
fähigkeit dieser Probe von dialysiertem Eieralbumin ausgeführt haben, und gefunden, daß diese Fähigkeit, wie es zu erwarten stand, merklich größer als die normale war (siehe übrigens Abhandlung II).

Ein anderer Krystallisationsversuch wurde mit derselben Probe dialysierten Eieralbumins vorgenommen, nachdem das Toluol mittels Wasserstoffdurchleitung ausgetrieben worden war, und hat sehr nahe dasselbe Resultat wie der erstere gegeben.

C. Die Proportionalitätsmethode.

Wenn man eine Eieralbuminlösung mit Ammoniumsulfat fällt, den auskrystallisierten Niederschlag nach dem Verlauf einiger Tage abfiltriert, und abgewogene Teile sowohl vom Filtrat als auch von dem Niederschlag mit anhängender Mutterlauge analysiert, dann kann man aus den Analysenresultaten gewisse Schlußsätze, die Zusammensetzung des Niederschlags betreffend, ziehen, indem man von der Voraussetzung ausgeht, daß die den Niederschlag umgebende Mutterlauge und das Filtrat beide dieselbe Zusammensetzung besitzen.¹⁾

Findet man nämlich, daß das Verhältnis zwischen den Gewichten des Ammoniumsulfats und des Wassers für das Filtrat und für die Krystalle mit anhaftender Mutterlauge dasselbe ist, dann kann der Schlußsatz gezogen werden, daß entweder die Krystalle kein Wasser und kein Ammoniumsulfat

¹⁾ Damit diese Voraussetzung stichhaltig sein kann, muß man bei der praktischen Ausführung eines solchen Versuches gewisse Vorsichtsmaßregeln innehalten, so z. B. muß man die Filtrierung solchermaßen einrichten, daß Verdampfung von Wasser ausgeschlossen ist, und den zuerst durchlaufenden Teil des Filtrats wegwerfen, weil dieser, der Adsorptionsfähigkeit des Filtrierpapiers wegen, eine andere Zusammensetzung als der Hauptteil haben kann. (Siehe übrigens Abhandlung III.)

enthalten, oder sie enthalten die beiden im selbigen Verhältnis, wie sie in der Mutterlauge vorhanden sind. Ergeben dagegen die Analysen, daß das Ammoniumsulfat im Filtrate in einem anderen Verhältnis zum Wasser als in den Krystallen mit umgebender Mutterlauge steht, und zwar z. B. so, daß der Niederschlag mit Mutterlauge für eine gegebene Menge Ammoniumsulfat mehr Wasser als das Filtrat enthält, dann wird das bedeuten, daß die Krystalle Wasser enthalten. Außer diesem Überschuß an Wasser können die Krystalle auch in diesem Falle Ammoniumsulfat und Wasser in demselben Verhältnis enthalten, in welchem diese beiden Stoffe im Filtrat auftreten. Die Anwendung dieses Prinzips, für welche wir den Namen «die Proportionalitätsmethode» benutzen, kann in mehreren Fällen von Nutzen sein; wir wollen ihr in diesem Abschnitte etwas näher treten, indem wir vorläufig übersichtlichkeithalber unsere Betrachtungen auf das oben skizzierte Beispiel begrenzen.

Wir schicken die Bemerkung voraus, daß eine solche Analyse sogleich zeigt, daß das auskrystallisierte Eialbumin bedeutende Mengen von Wasser enthält.¹⁾ Ob die Krystalle außerdem noch Ammoniumsulfat plus Wasser in demselben Verhältnis enthalten, in welchem diese Körper im Filtrat vorkommen, lassen wir vorläufig beiseite.

Bezeichnet man den Inhalt von

| | |
|---|--|
| Ammoniakstickstoff in 100 g Filtrat mit a_f | |
| » » » 100 » Niederschlag mit a_b | |
| Proteinstickstoff » 100 » Filtrat mit p_f | |
| » » » 100 » Niederschlag p_b | |

¹⁾ Die Größe der hier in Rede stehenden Wassermenge betreffend, bemerken wir hier nur, indem wir mit Bezug auf die Einzelheiten auf die Abhandlung III verwiesen, daß — während reines eingetrocknetes oder koaguliertes Eialbumin nach Thomas B. Osborne und George F. Campbell (Journ. Americ. Chem. Soc., Bd. 22, S. 440 [1900]) 15,51 % Stickstoff enthält, und daß also der Faktor, mit welchem der Proteinstickstoff zu multiplizieren ist, um das Gewicht des Albumins zu erhalten, gleich 6,45 ist —, wir gefunden haben, daß man das Gewicht des krystallisierten wasserhaltigen Eialbumins durch Multiplizieren des Proteinstickstoffes mit einem Faktor = 7,86 bekommt, und daß die auf 1 g Eialbumin kommende Wassermenge demnach 0,22 g ist.

und nennt man den Faktor, mit welchem man den Proteinstickstoff zu multiplizieren hat, um das Gewicht von wasserhaltigem Eieralbumin, «Eihydrat», zu bekommen, x , dann wird 100 g Filtrat aus

$$\begin{aligned} a_f \cdot 4,7163 & \quad \text{g Ammoniumsulfat,}^1) \\ p_f \cdot x & \quad \text{» Eihydrat}^2) \text{ und} \\ (100 \div a_f \cdot 4,7163 \div p_f \cdot x) & \quad \text{» Wasser} \end{aligned}$$

bestehen.

100 g Niederschlag (mit anhaftender Mutterlauge) wird in Analogie hiermit

$$\begin{aligned} a_b \cdot 4,7163 & \quad \text{g Ammoniumsulfat,} \\ p_b \cdot x & \quad \text{» Eihydrat und} \\ (100 \div a_b \cdot 4,7163 \div p_b \cdot x) & \quad \text{» Wasser} \end{aligned}$$

enthalten.

Mit Bezug auf das Proportionalitätsprinzip muß man jetzt haben:

$$\frac{a_f \cdot 4,7163}{100 \div a_f \cdot 4,7163 \div p_f \cdot x} = \frac{a_b \cdot 4,7163}{100 \div a_b \cdot 4,7163 \div p_b \cdot x}$$

woraus man erhält

$$x = \frac{100 (a_f \div a_b)}{a_f \cdot p_b \div a_b \cdot p_f} \quad (1)$$

Die Formel (1) ist berechnet, und hat somit nur Gültigkeit unter der Voraussetzung, daß das auskrystallisierte Eihydrat nur Wasser, aber kein Ammoniumsulfat enthält. Wir werden jetzt die Sachlage für den Fall untersuchen, daß das auskrystallisierte Eihydrat außer Wasser noch Ammoniumsulfat

¹⁾ 4,7163 ist derjenige Faktor, mit welchem der Ammoniakstickstoff zu multiplizieren ist, um das entsprechende Gewicht an Ammoniumsulfat zu geben.

²⁾ Wir sind hier davon ausgegangen, daß die in der Mutterlauge vorhandene geringe Menge Eihydrat dieselbe Zusammensetzung hat wie die ausgeschiedenen Krystalle. Diese Voraussetzung ist wahrscheinlich nicht ganz stichhaltig, da aber der Gehalt der Mutterlauge an Eihydrat gewöhnlich nur einen kleinen Bruchteil von dem des Niederschlags ausmacht, so wird der eventuelle Fehler belanglos sein.

und Wasser in demselben Verhältnis wie die Mutterlauge enthält.

Wir benutzen dieselben Bezeichnungen wie oben, sodaß x denjenigen Faktor bezeichnet, mit welchem der Proteinstickstoff multipliziert werden muß, um das Gewicht des auskrystallisierten Eihydrats minus das in demselben eingehende Ammoniumsulfat zu geben; y ist der Faktor, welcher durch Multiplizieren des Proteinstickstoffes das Gewicht des in das Eihydrat eingetretenen Ammoniumsulfats gibt, und z bedeutet den Faktor, womit der Proteinstickstoff zu multiplizieren ist, wenn man das gesamte Gewicht des krystallisierten Eihydrats zu kennen wünscht. Man hat also:

$$z = x + y \quad (2)$$

100 g Filtrat enthalten demnach

$(a_f \cdot 4,7163 \div p_f \cdot y)$ g Ammoniumsulfat,
 $p_f \cdot z$ » Eihydrat (wasserhaltiges und ammoniumsulfathaltiges) und
 $(100 \div a_f \cdot 4,7163 + p_f \cdot y \div p_f \cdot z)$ » Wasser.

100 g Niederschlag (mit anhaftender Mutterlauge) enthalten

$(a_b \cdot 4,7163 \div p_b \cdot y)$ g Ammoniumsulfat,
 $p_b \cdot z$ » Eihydrat (wasserhaltiges und ammoniumsulfathaltiges) und
 $100 \div a_b \cdot 4,7163 + p_b \cdot y \div p_b \cdot z)$ » Wasser.

Zufolge des Proportionalitätsprinzipes muß jetzt

$$\frac{a_f \cdot 4,7163 \div p_f \cdot y}{100 \div a_f \cdot 4,7163 + p_f \cdot y \div p_f \cdot z} = \frac{a_b \cdot 4,7163 \div p_b \cdot y}{100 \div a_b \cdot 4,7163 + p_b \cdot y \div p_b \cdot z}$$

welche Gleichung durch eine einfache Rechnung die folgende gibt:

$$z = \frac{100 (a_f \div a_b)}{a_f \cdot p_b \div a_b \cdot p_f} + y \frac{100 (p_b \div p_f)}{4,7163 (a_f \cdot p_b \div a_b \cdot p_f)} \quad (3)$$

Die Gleichung (3) hat demnach die Form

$$z = r + s \cdot y \quad (4)$$

wo die Werte der Koeffizienten r und s aus der Gleichung (3) hervorgehen.

Gleichung (4) ist, weil mit zwei Unbekannten, unbestimmt, und jeder willkürliche Wert des y gibt einen entsprechenden Wert des z ; wird y gleich 0 gesetzt, fallen die Gleichungen (3) und (4) mit (1) zusammen, derart, daß man in diesem Falle $z = r = x$ bekommt, was auch zu erwarten war.

Da die Analysenresultate eines einzelnen Versuches nur die Berechnung der Koeffizienten r und s erlauben, so ist es nicht möglich, durch einen Versuch die beiden unbekanntes z und y der Gleichung (4) zu bestimmen, und es gibt Fälle, wo dieser Weg nicht weiter führt, und wo man zu Überlegungen ganz anderer Art, auf welche wir hier nicht eingehen können, greifen muß. Sehr oft aber kann man doch auch schon durch die Anwendung des Proportionalitätsprinzipes einen annähernden Wert von y erhalten, und da diese Größe sehr klein ist und $s \cdot y$ gewöhnlich nur ein Korrektionsglied repräsentiert, so kann es häufig gelingen, einen sehr nahe richtigen Wert von z zu finden. Dies wird der Fall sein, wenn es sich z. B. herausstellt, daß zwei in derselben Weise angestellte Versuche, wo nur die angewandten Ammoniumsulfatkonzentrationen ein wenig verschieden sind, verschiedene Werte sowohl für r (r_1 und r_2) als auch für s (s_1 und s_2) geben. Setzen wir jetzt voraus, daß z und y in beiden Versuchen denselben Wert besitzen, dann bekommt man, daß

$$z = r_1 + s_1 \cdot y = r_2 + s_2 \cdot y \text{ und} \\ y = \frac{r_1 \div r_2}{s_2 \div s_1} \quad (5)$$

Dieser Wert von y ist natürlich nur ein annähernder, er wird aber ungefähr der richtige sein für einen Versuch, dessen Ammoniumsulfatkonzentration in der Mitte derjenigen der beiden genannten Versuche liegt. Ist y gefunden, dann kann z berechnet werden und damit auch x , da $z = x + y$.

Betrachten wir jetzt die in den Gleichungen (3) und (4) eingehenden Koeffizienten, r und s , etwas näher:

$$r = \frac{100 (a_f \div a_b)}{a_f \cdot p_b \div a_b \cdot p_f}, \quad s = \frac{100 (p_b \div p_f)}{4,7163 (a_f \cdot p_b \div a_b \cdot p_f)}$$

Mit Bezug auf den Nenner dieser Koeffizienten wird a_f (unter solchen Umständen wie denjenigen, die wir hier betrachten) immer größer als a_b sein, und da p_f immer im Verhältnis zu p_b sehr klein sein wird, so kann man das Glied $a_b \cdot p_f$ sehr häufig ganz vernachlässigen. Jedenfalls ist die Größe des Nenners so gut als ausschließlich durch das Glied $a_f \cdot p_b$ bestimmt. Der Koeffizient r kann demnach in reduzierter, aber annähernd richtiger Form folgendermaßen geschrieben werden:

$$r = \frac{100 (a_f \div a_b)}{a_f \cdot p_b} = \frac{100}{p_b} \left(1 \div \frac{a_b}{a_f}\right).$$

Aus der in dieser Weise geschriebenen Formel ersieht man, daß ein Fehler in der Bestimmung von p_b mit seinem ganzen Gewicht, aber auch nicht mit mehr, wirken wird, und daß demgemäß ein solcher Fehler von 1% dem Werte von r einen Fehler von ebenfalls 1% beibringen wird.

Was a_b und a_f betrifft, ersieht man, daß, wenn die prozentischen Fehler dieser beiden Größen gleich groß und gleichgerichtet sind, sie sich gegenseitig aufheben. Ist dagegen die eine, aber nicht die andere dieser Größen mit einem Fehler behaftet, dann wird die Wirkung desselben in Abhängigkeit

der Größe $\frac{a_b}{a_f}$ vervielfältigt. Ist z. B. diese Größe = ca. 0,8, was oft vorkommen kann, dann ersieht man leicht, daß ein Fehler von 1‰ im Werte des a_b (nicht aber in dem des a_f) eine

viermal so große Änderung der Differenz $(1 \div \frac{a_b}{a_f})$, welche ja ungefähr gleich 0,2 wird, hervorbringen, und deshalb den Wert des r mit einem Fehler von 4‰ belasten muß. Man muß es sich deshalb sehr angelegen sein lassen, darüber genau zu wachen, daß die Ammoniakbestimmungen im Niederschlag und im Filtrat zur gleichen Zeit und in ganz gleicher Weise ausgeführt werden, damit man rechnen darf, daß die möglichen Fehlerquellen einen gleich großen Einfluß auf beide geübt haben (siehe übrigens Abschnitt D, S. 57).

Wenn man im Nenner des Koeffizienten s das Glied $a_b \cdot p_f$ und im Zähler das Glied p_f , welches p_b gegenüber verschwindend klein ist, weg wirft, dann kann man schreiben:

$$s = \frac{100 p_b}{4,7163 a_f \cdot p_b} = \frac{100}{4,7163 a_f}$$

und man ersieht, daß s nur von a_f abhängig ist.

Da nun $4,7163 \cdot a_f$ ein Ausdruck für die in 100 g des Filtrats vorhandene Menge Ammoniumsulfat ist, wird demzufolge s der Faktor sein, mit welchem das Gewicht des Ammoniumsulfats zu multiplizieren ist, um das Gewicht des entsprechenden Filtrats zu geben.

Da weiter y der Faktor ist, womit man den Proteinstickstoff multiplizieren muß, um die Menge des im entsprechenden Eihydrat eingetretenen Ammoniumsulfats zu erhalten, so ist $s \cdot y$ derjenige Faktor, welcher, mit dem Proteinstickstoff multipliziert, die in der demselben entsprechenden Menge Eihydrats enthaltene Filtratmenge gibt. Man sieht somit, daß die rechte Seite der Gleichung

$$z = r + s \cdot y$$

rein formell betrachtet, aus zwei Gliedern besteht, von welchen das erstere, r , wenn der Proteinstickstoff damit multipliziert wird, das Gewicht des Eieralbumins nebst dem darin eingehenden überschüssigen Wasser gibt, während das letztere, $s \cdot y$, wie oben auseinandergesetzt, denjenigen Faktor darstellt, mittels dessen man durch Multiplizieren des Proteinstickstoffes das Gewicht des im Eihydrat eingetretenen Filtrats erhält. Wir haben bei diesen Betrachtungen über s die für $p_f = 0$ geltende Formel benutzt; es ist aber leicht einzusehen, daß auch, wenn p_f von meßbarer Größe ist, a_f so lange den alles überwiegenden Einfluß auf den Wert von s behält, als p_f mit p_b verglichen, klein ist. Die von dem Grenzfall $p_f = 0$ abgeleiteten Überlegungen haben dann auch in solchen Fällen Gültigkeit.

Es ist bisher immer die Voraussetzung gewesen, daß das Eihydrat die beiden Bestandteile des Ammoniumsulfats in äquivalenten Mengen aufgenommen hat; dieses wird aber nur in speziellen Fällen stattfinden. Die oben entwickelten Formeln sind aber, wenn die Bedeutung der Faktoren x und y ein wenig abgeändert wird, auch dann zu gebrauchen, wenn

Ammoniak und Schwefelsäure in nicht äquivalenten Mengen gebunden sind.

Wir wollen zuerst den Fall betrachten, wo die Äquivalentkonzentration der gebundenen Schwefelsäure größer ist als die des gebundenen Ammoniaks (was bei Wasserstoffionenkonzentrationen, welche größer als $10-20 \cdot 10^{-6}$ sind [s. Abhandlung II], eintritt). Die ganze Menge gebundenes Ammoniak kann hier als Sulfat, ganz wie in den Berechnungen oben, betrachtet werden, während der «Überschuß» an Schwefelsäure wie gebundenes Wasser in Rechnung geführt wird. Demnach wird x in diesem Falle der Faktor sein, welcher, mit dem Proteinstickstoff als zweitem Faktor multipliziert, als Produkt das Gewicht des wasserhaltigen Eihydrats plus überschüssiger Schwefelsäure gibt. Ist nun ein Überschuß von q ccm $n/1$ -Schwefelsäure¹⁾ an ein Grammäquivalent Proteinstickstoff gebunden, dann bedeutet dieses, daß 14,01 g Proteinstickstoff $q \times 0,04904$ g Schwefelsäure gebunden halten. Der Proteinstickstoff mit $\frac{0,04904}{14,01} q = 0,0035 q$ multipliziert gibt demnach das Gewicht der gebundenen überschüssigen Schwefelsäure, und derjenige Faktor, mit welchem der Proteinstickstoff zu multiplizieren ist, um das Gewicht des wasserhaltigen aber ammoniak- und schwefelsäurefreien Eieralbumins zu geben, wird gleich $x \div 0,0035 q$ sein.

In dem Falle, daß mehr Ammoniak als Schwefelsäure gebunden — dieses trifft bei Wasserstoffionenkonzentrationen niedriger als $10-20 \cdot 10^{-6}$ zu — und — wie in den obenstehenden Formeln vorausgesetzt — das gesamte gebundene Ammoniak als Ammoniumsulfat berechnet ist, gibt die Berechnung einen zu hohen Wert von y und einen zu niedrigen Wert von x , indem ein Gewicht Wasser gleich dem Gewicht der dem überschüssigen Ammoniak äquivalenten Schwefelsäuremenge wie am Proteinstoff gebundenes Ammoniumsulfat gerechnet ist. Bindet nun ein Grammäquivalent Proteinstickstoff einen Überschuß von m ccm $n/1$ -Ammoniak, dann ist das Ge-

¹⁾ Das Verfahren bei der Bestimmung des Überschusses an Schwefelsäure bzw. Ammoniak wird in der folgenden Abhandlung II beschrieben.

wicht der damit äquivalenten Menge Schwefelsäure gleich $m \cdot 0,04904$ g, und der Faktor, womit der Proteinstickstoff multipliziert werden muß, um dieses Gewicht zu geben, wird gleich $m \cdot \frac{0,04904}{14,01} = 0,0035 \cdot m$ sein. In diesem Falle muß sowohl x als auch y korrigiert werden, und der Faktor, welcher durch Multiplizieren des Proteinstickstoffes das Gewicht des wasserhaltigen, aber ammoniak- und schwefelsäurefreien Albumins gibt, wird gleich $x + 0,0035 \cdot m$ werden, während derjenige Faktor, womit man den Proteinstickstoff multiplizieren muß, um das Gewicht des gebundenen Ammoniumsulfats nebst dem Überschuß an Ammoniak zu bekommen, gleich $y \div 0,0035 \cdot m$ wird. Wird endlich danach gefragt, wie dieser letztere Faktor zu teilen ist, wenn man den Gehalt sowohl an gebundenem Ammoniumsulfat als auch an überschüssigem Ammoniak berechnen will, dann findet man in ganz ähnlicher Weise wie oben, daß m ccm $n/1$ -Ammoniak $m \cdot 0,017034$ g Ammoniak enthält, weshalb man das Gewicht des überschüssigen gebundenen Ammoniaks durch Multiplizieren des Proteinstickstoffes mit $m \cdot \frac{0,017034}{14,01} = 0,0012 \cdot m$ bekommt, und der Faktor, mit welchem der Proteinstickstoff multipliziert werden muß, um das Gewicht des gebundenen Ammoniumsulfats zu geben, wird demzufolge $y \div 0,0035 \cdot m \div 0,0012 \cdot m = y \div 0,0047 \cdot m$ sein.

Tabelle 2.

| Das Eieralbumin enthält auf ein Gramm-äquivalent Proteinstickstoff | Durch Multiplizieren des Proteinstickstoffes mit dem untenstehenden Faktor bekommt man das Gewicht an | | | |
|--|---|---------------------------|---|------------------------------------|
| | wasserhaltigem aber schwefelsäure- u. ammoniakfreiem Eieralbumin | gebundenem Ammoniumsulfat | überschüssiger gebundener Schwefelsäure | überschüssigem gebundenem Ammoniak |
| Keinen Überschuß weder an Schwefelsäure noch an Ammoniak | x | y | — | — |
| q Kubikzentimeter überschüssige $n/1$ -Schwefelsäure | $x \div 0,0035 q$ | y | $0,0035 q$ | — |
| m Kubikzentimeter überschüssiges $n/1$ -Ammoniak | $x + 0,0035 m$ | $y \div 0,0047 m$ | — | $0,0012 m$ |

Man ist somit immer imstande, x und y wie oben angegeben zu berechnen, und z ist in allen Fällen gleich $x + y$, die Bedeutung aber von x und y ist in den verschiedenen Fällen verschieden; die Tabelle 2 gibt darüber eine Übersicht.

Wir haben in den vorstehenden Entwicklungen stets ein ganz bestimmtes Beispiel und zwar die Auskrystallisation des Eihydrats durch Zusatz von Ammoniumsulfat vor Augen gehabt; die Proportionalitätsmethode läßt sich aber auf mannigfaltige andere Fälle anwenden.

So haben wir, wenn auch vorläufig nur bei vereinzelt Versuchen, die Methode bei Untersuchungen über die Zusammensetzung des durch Erhitzen koagulierten Eieralbumins benutzt. Wenn nämlich 100 g einer ammoniumsulfathaltigen Eieralbuminlösung vor der Koagulation p_b g Proteinstoff und a_b g Ammoniakstickstoff enthalten, und wenn die Lösung demnächst in solcher Weise zum Koagulieren gebracht wird, daß dadurch kein Wasser und kein Ammoniak verloren geht, dann wird die koagulierte Mischung natürlich ebenfalls p_b g Proteinstickstoff und a_b g Ammoniakstickstoff in 100 g enthalten. Wird jetzt das koagulierte Eieralbumin abfiltriert, und hat die Analyse des Filtrats ergeben, daß 100 g desselben p_f g Proteinstickstoff und a_f g Ammoniakstickstoff enthalten, dann ist es ein Leichtes einzusehen, daß man mittels dieser Analysen ganz dieselben Formeln wie in dem oben ausführlich behandelten Beispiel ableiten kann.

Nicht weniger interessant sind die Anwendungen, welcher die Proportionalitätsmethode beim Studium der kolloiden Lösung an sich fähig ist. Behandelt man z. B. eine ammoniumchloridhaltige, aber sonst reine Eieralbuminlösung mit einem Überschuß von festem Ammoniumchlorid, dann wird das Albumin nicht gefällt, sondern es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Phasen der kolloiden Lösung ein, und es wird dann möglich sein, mittels der Proportionalitätsmethode Schlußsätze über die Zusammensetzung der dispersen Phase zu ziehen. Dem «Filtrat» entspricht hier das Dispersionsmittel,

d. h. eine bei der Versuchstemperatur gesättigte Lösung von Ammoniumchlorid, dessen Zusammensetzung leicht zu ermitteln ist. Dem «Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge» entspricht die disperse Phase mit umgebendem Dispersionsmittel, somit die kolloide Lösung selbst, dessen Analyse nach dem Abfiltrieren des überschüssigen Ammoniumchlorids unter angemessenen Vorsichtsmaßregeln sich bewerkstelligen läßt. Bei derartigen Versuchen, die wir übrigens noch keine Gelegenheit auszuführen gehabt haben, kann man natürlich nicht das Ammoniumsulfat gebrauchen, weil das Albumin durch Sättigung seiner Lösung mit diesem Salz völlig ausgefällt wird.

Weit mehr leistungsfähig wird jedoch die Methode durch die Einschabung einer halbdurchlässigen Wand zwischen die kolloide Lösung und das Dispersionsmittel. In dieser Form haben wir die Methode bei sehr vielen in der Abhandlung V beschriebenen Versuchen benutzt, bei welchen die betreffende kolloide Lösung, meistens eine ammoniumsulfathaltige Eieralbuminlösung, in einem Kollodiumhäutchen angebracht war, welches seinerseits in eine der Zusammensetzung der Albuminlösung angemessene Ammoniumsulfatlösung aufgehängt wurde. Der Versuch wurde angestellt in der Weise, daß die Albuminlösung, die «Innenflüssigkeit», mit einem Druck belastet wurde, welcher den osmotischen Druck derselben kompensierte, und das Häutchen wurde bei konstanter Temperatur mehrere Tage hindurch in der Ammoniumsulfatlösung, der «Außenflüssigkeit», belassen, um ein vollständiges Diffusionsgleichgewicht zwischen Innen- und Außenflüssigkeit herzustellen. Sodann wurde sowohl die Innen- als die Außenflüssigkeit analysiert und die durch die Analyse erhaltenen Resultate nach der Proportionalitätsmethode bearbeitet, indem hier die Außenflüssigkeit dem Filtrat und die Innenflüssigkeit dem «Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge» entsprach.

Es kann kaum in Zweifel gezogen werden, daß die Methode in dieser Gestalt bei der Untersuchung der verschiedenartigsten kolloiden Lösungen gute Dienste leisten kann, und es ist wahrscheinlich, daß man auf diesem Wege wertvolle Aufschlüsse über die Beschaffenheit der dispersen Phase erlangen kann.

Ganz besonders aber darf man wohl hoffen, in dieser Weise Aufschlüsse darüber zu bekommen, welchen Einfluß eine Änderung der Zusammensetzung des Dispersionsmittels auf die Zusammensetzung der dispersen Phase ausübt.

D. Stickstoffbestimmungsmethoden.

Schon die vorhergegangenen Abschnitte zeigen, daß die quantitative Behandlung der in den gegenwärtigen Abhandlungen gestellten Fragen ganz wesentlich auf Bestimmungen des Protein- und Ammoniakstickstoffes in den zu untersuchenden Lösungen oder Mischungen von Krystallen und Mutterlauge fußen. Von weniger wesentlicher Bedeutung ist die Bestimmung des von nicht koagulierbaren Proteinstoffen herrührenden Stickstoffs, weil diese Bestimmung gewöhnlich nur den Zweck hat, die Abwesenheit dergleichen Stoffe festzustellen.

Wir haben, wie es sich von selbst ergibt, auf jegliche Weise die möglichst große absolute Genauigkeit bei diesen Bestimmungen angestrebt, nicht weniger aber sind unsere Bestrebungen bei solchen Analysen, wo das von Belang sein konnte, auf die Erreichung derselben relativen Genauigkeit gerichtet gewesen. Schon im vorigen Abschnitt ist bei der Erwähnung der Bestimmung der Faktoren x , y und z mittels der Proportionalitätsmethode bemerkt worden, daß es bei Untersuchungen dieser Art von größter Bedeutung ist, daß die Ammoniakstickstoffbestimmungen im «Filtrat» und im «Niederschlag mit anhaftender Mutterlauge» oder in der «Innen- und Außenflüssigkeit» mit demselben prozentischen Fehler behaftet sind. Wir sind deshalb bei solchen Analysen immer bemüht gewesen, durch vollständig gleichartige Behandlung der beiden vorliegenden Lösungen denselben Grad der Genauigkeit zu erreichen. Nehmen wir zum besseren Verständnis ein bestimmtes Beispiel: Bei der Analyse der ammoniumsulfat- und proteinhaltigen Innenflüssigkeit und der entsprechenden, aber proteinfreien Außenflüssigkeit haben wir solche Mengen der Lösungen in Arbeit genommen, daß der Gehalt an Ammoniakstickstoff in den Proben der beiden Lösungen so nahe wie

möglich dergleiche war, und sodann alle Proben ganz gleich behandelt. Wie wir nach Zusatz von Essigsäure und Natriumacetat (siehe S. 59) die Innenflüssigkeit, um das Eieralbumin auszukoagulieren, erhitzt haben, so haben wir auch die Außenflüssigkeit in derselben Weise behandelt und sie ebenso lange erhitzt, und zwar auch dann, wenn kein Niederschlag entstand. Wir haben alle Proben zur gleichen Zeit durch Filter derselben Art und Größe filtriert, so wie die Niederschläge der Innenflüssigkeit und die leeren Filter der Außenflüssigkeit gleichzeitig und mit derselben Menge Wasser ausgewaschen. Schließlich haben wir beim Abdestillieren des Ammoniaks und bei der nachfolgenden Titrierung wechselweise Proben von der Außen- und der Innenflüssigkeit behandelt. Wir meinen hierdurch erreicht zu haben, daß die eventuellen Fehlerquellen soweit wie möglich bei den Analysen beider Lösungen dieselbe Rolle spielen, welches nach dem früher Entwickelten von wesentlicher Bedeutung ist. (Vgl. auch S. 70.)

Da etwa 20 mg diejenige Stickstoffmenge ist, welche die genaueste Kjeldahl-Bestimmung gibt, so haben wir, soweit es anging, die zum Analysieren abgewogenen Proben der Innenflüssigkeiten oder der gelösten Niederschläge von einer solchen Größe genommen, daß der Proteinstickstoff 15—20 mg betrug. Der Ammoniakgehalt des vom auskoagulierten Albumin abgelaufenen Filtrats war infolgedessen bisweilen sehr groß, bisweilen ganz klein, und er wurde deshalb je nachdem in verschiedener Weise ermittelt. Wenn sehr wenig Ammoniak vorhanden war, dann wurde der Ammoniakstickstoff in einer größeren Portion bestimmt, dessen Albumingehalt für die Kjeldahlbestimmung zu groß war; neben dieser Bestimmung wurde der Totalstickstoff in kleineren Proben nach Kjeldahl ermittelt, und der Unterschied zwischen dem Total- und dem Ammoniakstickstoff gab dann den Proteinstickstoff.

Unten geben wir eine detaillierte Beschreibung des in den verschiedenen Fällen befolgten Verfahrens, und schließlich soll eine Reihe Kontrollversuche, welche wir zur Beleuchtung der Genauigkeit unserer Methoden gemacht haben, Erwähnung finden.

a) Bestimmung des Totalstickstoffs.

Eine gemessene oder gewogene Menge der zu analysierenden Lösung wird in einem langhalsigen Jena-Kolben (250 ccm) nebst 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure, 5 g Kaliumsulfat und einem Stückchen Kupferdraht (etwa 50 mg), über einen guten Argandschen Brenner, anfänglich; bis das Wasser verdampft ist, vorsichtig, später stärker erhitzt, so daß die Flüssigkeit immer auf dem Siedepunkte oder demselben sehr nahe ist. Man erhitzt — unter wiederholtem Schütteln, um alle verkohlten Partikeln in die Flüssigkeit zu bringen und vollständig aufzuschließen —, bis die Flüssigkeit rein hellgrün ist (2—4 Stunden) und danach noch weiter 5 Stunden lang. Sodann oxydiert man die noch siedend heiße Flüssigkeit durch Einstreuen von 3 mal einem Spatelvoll trockenes Kaliumpermanganatpulver, indem der Kolben nach jedem Spatelvoll gut geschüttelt wird. Nach Abkühlung zu Zimmertemperatur wird der Kolbeninhalt mit Wasser verdünnt, und das Ammoniak in gewöhnlicher Weise abdestilliert.

Als «Kontrolle» dienen Versuche mit denselben Mengen der angewandten Reagentien, wozu statt der zu analysierenden Lösung 5 Tropfen einer 10%igen Rohrzuckerlösung gegeben werden. Diese «Kontrollen» werden gleichzeitig mit den eigentlichen Analysen erhitzt und auf ganz dieselbe Weise destilliert.

b) Bestimmung des Stickstoffs der anwesenden koagulierbaren Proteinstoffe.

Man mißt oder wiegt die zu analysierende Flüssigkeit in einem kleinen Erlenmeyer-Kolben (150 ccm) ab, gibt 10 ccm $n/1$ -Essigsäure, 10 ccm $n/1$ -Natriumacetatlösung¹⁾ zu und füllt

¹⁾ Soll der Ammoniakstickstoff des Filtrats ermittelt werden, dann gibt man, vor der Koagulation, um eine etwaige Verflüchtigung des Ammoniaks während des Erhitzens zu verhüten, nur 10 ccm $n/1$ -Essigsäure und 2 ccm $n/1$ -Natriumacetatlösung nebst Wasser zu, und die fehlenden 8 ccm $n/1$ -Natriumacetatlösung werden — um Infektion vorzubeugen — erst am Tage vor dem Filtrieren zugesetzt. Bei der von dem Puffergemisch «10 ccm $n/1$ -Essigsäure — 10 ccm $n/1$ -Natriumacetatlösung» bedingten Wasserstoffionenkonzentration scheidet sich das koagulierte Eialbumin vollständig aus.

mit Wasser bis auf etwa 100 ccm auf, wonach man auf dem siedenden Wasserbade $1\frac{1}{2}$ Stunde unter/wiederholtem Schütteln erhitzt, was das Albumin zum Auskoagulieren bringt.

Nach Abkühlung¹⁾ wird durch ein so weit wie möglich stickstofffreies, mittels warmen Wassers ausgewaschenes Filter (wir benutzen die Marke: «C. Schleicher & Schüll Nr. 589», $12\frac{1}{2}$ cm) filtriert, und der Niederschlag gründlich mit warmem Wasser gewaschen. Danach wird das Filter mit dem Niederschlag in den Aufschließungskolben hineingebracht und wie unter a) beschrieben behandelt, indem man zuerst den beim Filtrieren und Koagulieren benutzten Trichter und Kolben mit der zur Aufschließung bestimmten Schwefelsäure abspült.

Als «Kontrolle» dienen ähnliche blinde Versuche wie die unter a) beschriebenen, nur wird nicht Rohrzucker, sondern ein Filter zugegeben, welches von gleicher Art und Größe und in derselben Weise wie bei den eigentlichen Analysen gewaschen und behandelt worden ist.

c) Bestimmung des Stickstoffs der anwesenden nicht koagulierbaren Proteinstoffe.

Von stickstoffhaltigen Verbindungen enthält das von koaguliertem Proteinstoff befreite Filtrat²⁾ die gegenwärtigen Ammoniumsalze nebst möglicherweise nicht koagulierbaren und in alkalischer Flüssigkeit nicht flüchtigen Körpern. Diese letzteren werden unter dem Namen «nicht koagulierbare Proteinstoffe» zusammengefaßt und deren Menge wird dadurch bestimmt, daß man das Ammoniak aus alkalischer Flüssigkeit abdestilliert und im Rückstand den Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Das gesamte Filtrat vom koagulierten Proteinstoff oder

¹⁾ Wenn der warme Kolben nach der Koagulation mit einer Glasplatte bedeckt wird, kann man ihn ohne Schaden viele Tage vor dem Filtrieren stehen lassen.

²⁾ Das Filtrat wird sich gewöhnlich nur wenige Tage von Schimmelpilzen frei halten können. Da es indessen bei großen Versuchsreihen oft notwendig wird, Filtrate längere Zeit hindurch aufbewahren zu können, so haben wir immer sofort nach dem Filtrieren 20 ccm 2 n-Schwefelsäure zu jedem Filtrat zugegeben; es läßt sich dann lange unverändert aufheben.

ein aliquoter Teil desselben wird in einem geräumigen Kolben mit ein wenig Phenolphthalein und der zur Freimachung alles Ammoniaks notwendigen Menge 2 n-Natronlösung versetzt, wonach das Ammoniak im Vakuum bei einer Temperatur von 30° abdestilliert wird. Nachdem man fast zur Trockenheit eingedampft hat, nimmt man den Rückstand wieder in Wasser auf, und die Lösung muß jetzt stark alkalisch reagieren, wenn nicht, ist mehr Natronlösung zuzufügen. Nach guter Abspülung sämtlicher Teile des Eindampfungsapparates wird wieder wie das erste Mal fast zur Trockenheit verdampft; schließlich wird diese Operation zum dritten und bei ammoniumsulfatreichen Filtraten noch zum vierten Mal wiederholt. Der solcherweise erhaltene völlig ammoniakfreie Rückstand wird mittels möglichst wenig Wassers in einen der gewöhnlichen Aufschließungskolben gebracht, konzentrierte Schwefelsäure zuerst bis zu saurer Reaktion vorsichtig zugefügt und danach noch weiter 10 ccm. Nach Verdampfung des gegenwärtigen Wassers wird die Stickstoffbestimmung wie unter a) beschrieben durchgeführt, jedoch ohne Oxydieren mit Kaliumpermanganat.

Versuche, bei welchen reines Wasser oder eine Ammoniumsulfatlösung angemessener Stärke, wie oben beschrieben, mit denselben Mengen derselben Natronlösung, die bei den eigentlichen Analysen gebraucht wurden, eingedampft wird, dienen als «Kontrolle». In dem erhaltenen Rückstand bestimmt man den Stickstoff zu gleicher Zeit und in derselben Weise wie in den Analysen.

d) Bestimmung des Ammoniakstickstoffs, wenn mehr als 50 mg vorhanden ist.

Das mit 20 ccm 2 n-Schwefelsäure versetzte (s. oben S. 60, Anm.) Filtrat und Waschwasser vom auskoagulierten Eialbumin, zusammen etwa 500 ccm, wird in einen gewogenen Literkolben gebracht, mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gewogen. Von dieser Lösung wiegt man zum mindesten 3 gleich große Proben, jede etwa 20 mg Ammoniakstickstoff enthaltend, ab. Aus diesen Proben destilliert man mittels Natronlauge das Ammoniak in eine mit etwa $\frac{n}{7}$ -Salzsäure beschickte Vor-

lage ab und titriert die überschüssige Salzsäure jodometrisch¹⁾ mittels etwa $n/_{14,01}$ -Thiosulfatlösung in der üblichen Weise.

Gleichzeitig mit den Proben destilliert man in derselben Weise zwecks Festlegung des Titers der Thiosulfatlösung wenigstens 3 gewogene Proben einer Lösung von reinem, bei 70° im Vakuum getrocknetem Ammoniumsulfat, welches somit die Urtitersubstanz aller Analysen wird. Auch die Größe dieser Proben wird derart bemessen, daß jede etwa 20 mg Stickstoff enthält, und zu jeder Probe werden dieselben Mengen von Essigsäure, Natriumacetat und Schwefelsäure gegeben, wie diejenige, die in den Analysen vorhanden sind. Als «Kontrolle» sowohl für die «Analyse-Proben» als auch für die «Einstellungsproben» destilliert man reines Wasser, zu welchem man dieselben Mengen sämtlicher Reagentien gefügt hat, wie zu den Analysen.

Die bei der Destillation angewandte Wassermenge wird so bemessen, daß das Gesamtvolumen 300—325 ccm wird, und hierzu gibt man 25 ccm starke Natronlauge. Das Destillat wird in 15 ccm etwa $n/_{7}$ -Salzsäure aufgefangen, und es wird so viel abdestilliert (etwa 150—180 ccm), daß man nach dem Titrieren ein Totalvolumen von etwa 200 ccm hat.

Um weiter nach Möglichkeit eventuelle Fehlerquellen unschädlich zu machen, sind die Destillationen immer in nachstehender Reihenfolge ausgeführt worden; zuerst wird der Destillationsapparat reinigungshalber ausgedampft, indem man ohne Kühlwasser reines, mit ein wenig Natronlauge versetztes Wasser destilliert. Sodann destilliert man die «Kontrolle». Die nächste Destillation gilt einer Ammoniumsulfatlösung mit annäherungsweise derselben Menge Ammoniak wie die zu untersuchenden Proben, und dann erst geht man zur Destillation der «Analysen» — und der «Einstellungs-Proben» über. Der Zweck dieser «vorbereitenden» Destillation, bei welcher die gewöhnlichen 15 ccm $n/_{7}$ -Salzsäure vorgelegt sind, ist derjenige den Destillationsapparat vor der ersten Destillation

¹⁾ Bezüglich der Prinzipie der jodometrischen Säuretitrierung wird auf R. Koefoed, Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, Bd. 10, S. 52 (1911) verwiesen.

genau in den gleichen Stand wie nach derselben, das heißt vor der zweiten Destillation, zu bringen. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß, auch wenn das Volumen bei der Destillation innerhalb der genannten Grenzen gehalten und das Destillieren so weit wie oben angegeben getrieben wird, kleine, aber durch die Neßler-Probe sicher nachweisbare Ammoniakmengen im Destillierapparat zurückgehalten werden. Es ist mit Rücksicht hierauf, daß die oben genannte vorbereitende Destillation notwendig wird, damit man sicher sein kann, daß sämtliche Proben, sowohl die der «Analyse» als auch die der «Einstellung» unter genau denselben Bedingungen destilliert werden, und daß demgemäß eventuelle Fehler die Analysen und die Einstellung des Thiosulfats gleichmäßig beeinflussen und sich deshalb gegenseitig aufheben.

- e) Bestimmung des Ammoniakstickstoffs, wenn
25—50 mg vorhanden sind.

Filtrat und Waschwasser werden in einem Meßkolben bis auf 500 ccm aufgefüllt, gut durchgeschüttelt und dann mittels eines 250 ccm-Meßkolbens in zwei ungefähr gleiche Teile geteilt. Jeder dieser Teile wird getrennt destilliert und titriert, indem jeder der Meßkolben mit 50—75 ccm Wasser nachgespült wird. Der Gehalt des Filtrats an Ammoniakstickstoff wird demnach als die Summe der beiden Titrierungen erhalten. Übrigens ist das Verfahren ganz wie unter d) beschrieben, nur wählt man natürlich den Ammoniakgehalt der «Einstellungsproben» dem Gehalt der einen Hälfte des Filtrats einigermaßen gleich.

- f) Bestimmung des Ammoniakstickstoffs, wenn
10—25 mg vorhanden sind.

In diesem Fall muß das Volumen des Filtrats nach Zusatz der 20 ccm 2 n-Schwefelsäure etwa 300 ccm ausmachen, und das gesamte Filtrat wird auf einmal destilliert, indem man mit 25—30 ccm Wasser nachspült. Die «Einstellungsproben» erhalten eine Ammoniakmenge gleich derjenigen des Gesamtfiltrats, übrigens verfährt man wie oben beschrieben.

g) Bestimmung des Ammoniakstickstoffs, wenn weniger als 10 mg vorhanden ist.

Je kleiner der Gehalt des Filtrats an Ammoniak ist, um so größer ist die Rolle, die die obengenannte Fehlerquelle, Zurückhalten von ganz kleinen Ammoniakmengen sowohl im Destillationskolben als auch im Wasch- und Kühlapparat, spielt, und zwar weil man selbstverständlich nicht damit rechnen darf, daß diese kleinen Mengen gleich groß sind, auch nicht dann, wenn gleich große Mengen von Ammoniak abzudestillieren sind und die Destillation das eine wie das andere Mal so weit als irgend möglich in derselben Weise geleitet wird. Hierzu kommt noch außerdem, daß es, wenn sehr ammoniumsulfatarme Albuminlösungen zu verarbeiten sind, notwendig wird, daß man ziemlich reichlich bemessene Mengen der Lösung zur Analyse nimmt, weil die zur Bestimmung kommende Ammoniakmenge sonst zu winzig wird.¹⁾ Wegen der großen Menge von Eieralbumin muß dann vor der Koagulation etwas mehr Wasser als gewöhnlich (150—200 ccm) zugesetzt werden und aus demselben Grund muß mehr Wasser beim Auswaschen benutzt werden. Der Rauminhalt des Filtrats wird deshalb so groß, daß das Ammoniak sich kaum durch eine einfache Destillation so vollständig abtreiben läßt, daß man von der oben genannten Fehlerquelle absehen darf. In diesem Falle kommt deshalb ein etwas umständlicheres Verfahren zur Verwendung.

Das auskoagulierte Albumin wird wie üblich abfiltriert und gewaschen, wenn aber das gesamte Volumen von Filtrat und Waschwasser 500 ccm erreicht hat (Filtrat I), dann wird der Niederschlag — falls wesentlich größer als gewöhnlich — aus dem Filter genommen und mit warmem Wasser in einer Schale gut ausgerührt, wonach er wieder auf den Filter gebracht und mit warmem Wasser gewaschen wird, bis dieses zweite Filtrat (Filtrat II), welches getrennt gesammelt wird, 300 ccm ausmacht. Das ganze Filtrat I wird auf einmal destilliert (es

¹⁾ In solchen Fällen wird der Proteinstoff als der Unterschied zwischen dem Gesamtstickstoff (in besonderen Proben nach [a] bestimmt) und dem Ammoniakstickstoff bestimmt.

wird mit 25—30 ccm Wasser nachgespült), das Ammoniak in etwa $n/35$ -Salzsäure aufgefangen und der Überschuß der Salzsäure jodometrisch mittels etwa $n/70,05$ -Thiosulfats zurücktitriert. Die Destillation wird übrigens nach d) ausgeführt; nachdem aber diese erste Destillation, bei welcher so gut wie alles Ammoniak übergeht, zu Ende gebracht ist, wird ein langhalsiger mit 5 ccm $n/7$ -Salzsäure beschickter 200 ccm Meßkolben als Vorlage eingeschaltet und die Destillation fortgesetzt, bis das Destillat den Meßkolben zur Marke füllt. Der Ammoniakgehalt dieses zweiten Destillats wird durch Zugabe von 5 ccm $n/5$ -Natronlösung nebst 2 ccm alkalischer Kaliumquecksilberjodidlösung¹⁾ kolorimetrisch nach Neßler bestimmt. Das Destillat des Filtrats II wird ebenfalls in einem 200 ccm-Meßkolben aufgefangen und das Ammoniak nach Neßler bestimmt.

Wir benutzen in diesen Fällen immer frisch ausgekochte Natronlauge bei der Destillation und es folgt von selbst, daß wir darum besorgt sind, daß die «Analyse-» und die «Einstellungsproben» soweit als irgend möglich gleich behandelt werden. Die Vergleichflüssigkeit bei den Neßler-Bestimmungen bereiten wir aus Ammoniumsulfatlösungen von bekannter Stärke, indem eine abgemessene, passende Menge mit 5 ccm $n/7$ -Salzsäure versetzt und mit Wasser auf 200 ccm aufgefüllt wird, wonach 5 ccm $n/5$ -Natronlösung nebst 2 ccm der Kaliumquecksilberjodidlösung zugegeben werden. Die eigentliche Bestimmung der Farbenstärke der «Neßler-Analysen», das Vergleichen mit derjenigen der Vergleichsflüssigkeiten, wird am Tage nach der Herstellung der Proben mittels eines gewöhnlichen Kolorimeters gemacht.

h) Kontrollversuche die Bestimmung des Ammoniakstickstoffs betreffend.

Der Zweck dieser Kontrollversuche ist es gewesen, teils eine Schätzung der Genauigkeit der verschiedenen angewandten Ammoniakbestimmungsmethoden zu beschaffen, und teils zu

¹⁾ Bezüglich der Kaliumquecksilberjodidlösung wird auf A. Classen, Analytische Chemie, Bd. 2, S. 115 (1903) verwiesen.

untersuchen, ob die Ammoniakbestimmung sich mit derselben Genauigkeit durchführen läßt, wenn Albumin vorhanden ist, wie ohne dasselbe.

Als Ur- oder Stammlösung benutzen wir bei diesen Versuchen eine Ammoniumsulfatlösung, welche 783,6 mg Ammoniakstickstoff in 100 g Lösung enthielt, was bei einer früheren sehr sorgfältigen Analyse festgelegt worden war.

Die benutzte Lösung von Albumin stellten wir uns aus krystallisiertem Eieralbumin dar, welches in gewöhnlicher Weise durch 6 Krystallisationen mit Ammoniumsulfat gereinigt und danach durch 6 Krystallisationen mit Natrium- und Kaliumsulfat¹⁾ von Ammoniak befreit worden war. 100 ccm dieser Lösung enthielten 226,6 mg Proteinstickstoff, aber nur 0,03 mg Ammoniakstickstoff.

Es wurden drei Versuchsreihen mit verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen und demzufolge mittels verschiedener Ammoniakbestimmungsmethoden ausgeführt.

Versuchsreihe A.

(Versuche Nr. 1 bis 6.)

Bei jedem Versuch haben wir 50 ccm Urlösung (gewogen) in Arbeit genommen. In den Versuchen Nr. 1 bis 3 wurde kein Eieralbumin, sondern nur Essigsäure, Natriumacetat und Schwefelsäure zugegeben und das Ammoniak nach d) bestimmt.

In den Versuchen Nr. 4 bis 6 dagegen gaben wir 10 ccm Albuminlösung zu, wonächst die Lösung nach Zusatz von Essigsäure und Natriumacetat (s. S. 59, Anm.) nach b) zur Koagulation gebracht wurde. Nachdem der Niederschlag abfiltriert war, wurde der Ammoniakstickstoff des Filtrats wie unter d) ermittelt.

Die Resultate sind in der untenstehenden Tabelle 3 zusammengetragen.

¹⁾ Die Krystallisation des Eieralbumins vermitteltst anderer Stoffe als Ammoniumsulfat wird in einer folgenden Abhandlung behandelt werden.

Tabelle 3.

Versuchsreihe A.

(Stärke der Thiosulfatlösung: 1,0022 · n/14,01.)

| Ver- suchs- nummer | Gewicht von 50 ccm der Urlösung g | Gewicht nach der Ver- dünnung bis zu 1 l g | Gewicht der bei der Destilla- tion benutzten 3 · 50 ccm g | Beim Titrieren wurde eine a ccm der Thiosulfatlös- g. entsprechende Ammoniakmenge gefunden a |
|--------------------------|--|--|---|--|
| Ohne Eialbumin | | | | |
| 1 | 50,9466 | 1000,01 | { 49,8106 49,8206 49,7794 | 19,90 19,88 19,86 |
| 2 | 50,9504 | 1000,01 | { 49,8085 49,8057 49,7971 | 19,85 19,85 19,90 |
| 3 | 50,9480 | 1000,23 | { 49,8315 49,8058 49,8677 | 19,91 19,85 19,92 |
| Mittel .. | 50,9483 | 1000,08 | 49,8141 | 19,880 |

100 g der Urlösung enthalten demnach 785,1 mg¹⁾ Ammoniakstickstoff.

| | | | | |
|---|---------|---------|---------------------------------|-------------------------|
| Mit Eialbumin (22,66 mg Proteinstickstoff) | | | | |
| 4 | 50,9592 | 1000,04 | { 49,7904 49,7854 49,7914 | 19,91 19,91 19,87 |
| 5 | 50,9678 | 1000,21 | { 49,8000 49,7977 49,7758 | 19,88 19,87 19,84 |
| 6 | 50,9512 | 1000,21 | { 49,7976 49,8522 49,8206 | 19,90 19,89 19,89 |
| Mittel .. | 50,9594 | 1000,15 | 49,8012 | 19,884 ²⁾ |

100 g der Urlösung enthalten demnach 785,3 mg Ammoniakstickstoff.

Versuchsreihe B.

(Versuche Nr. 7 bis 14.)

50 ccm der Urlösung wurden abgewogen (Gew. 50,9310 g) und in einem geeichten Meßkolben bis auf 1 l verdünnt. Für

$$1) \frac{19,880 \cdot 1,0022 \cdot 1000,08 \cdot 100}{49,8141 \cdot 50,9483} = 785,1.$$

2) Die Korrektion wegen des Ammoniakgehalts des Eiweißes ist hier verschwindend klein, nämlich 0,003 · 50/1000 mg Ammoniakstickstoff.

jeden Versuch wurden mittels einer geeichten Pipette 50 ccm der verdünnten Lösung, die nicht gewogen wurden, herausgenommen.

Bei den Versuchen Nr. 7 bis 10 wurde kein Eialbumin zugefügt. Das Ammoniak wurde nach f) bestimmt.

Bei den Versuchen 11 bis 14 wurden 10 ccm Eialbuminlösung zugesetzt. Nach vollbrachter Koagulation usw. bestimmte man den Ammoniakstickstoff nach f).

Die Resultate findet man in der untenstehenden Tabelle 4.

Tabelle 4.

Versuchsreihe B.

(Stärke der Thiosulfatlösung: 1,0022 · n/14,01.)

| Ver- suchs- nummer | Beim Titrieren wurde eine a ccm der Thiosulfat- lösung entsprechende Menge Ammoniak gefunden a | Ver- suchs- nummer | Beim Titrieren wurde eine a ccm der Thiosulfat- lösung entsprechende Menge Ammoniak gefunden a |
|---|--|---|--|
| | Ohne Eialbumin | | Mit Eialbumin (22,66 mg Proteinstickstoff) |
| 7 | 19,94 | 11 | 19,94 |
| 8 | 19,94 | 12 | 19,95 |
| 9 | 19,91 | 13 | 19,93 |
| 10 | 19,91 | 14 | 19,94 |
| Mittel ... | 19,925 | Mittel .. | 19,940 ¹⁾ |
| 100 g der Urlösung enthalten somit 784,2 mg Ammoniakstickstoff | | 100 g der Urlösung enthalten somit 784,6 mg Ammoniakstickstoff | |

Versuchsreihe C.

(Versuche Nr. 15 bis 26.)

20 ccm der Urlösung wurden abgewogen (Gew. 20,3881 g) und in einem geeichten Meßkolben bis auf 1 l verdünnt. Für jeden Versuch wurden mittels einer geeichten Pipette 50 ccm der verdünnten Lösung, die nicht gewogen wurden, herausgenommen.

¹⁾ Die Korrektion wegen des Ammoniakgehalts der Albuminlösung ist hier gleich 0,003 mg Ammoniakstickstoff.

Bei den Versuchen Nr. 15 bis 18 wurde kein Eialbumin zugefügt. Das Ammoniak wurde nach g) bestimmt.

Bei den Versuchen Nr. 19 bis 22 wurden 10 ccm und bei den Versuchen Nr. 23 bis 26 50 ccm Eialbuminlösung zugegeben. Nach vollbrachter Koagulation usw. wurden der Ammoniakstickstoff nach g) bestimmt.

Die Resultate findet man in der untenstehenden Tabelle 5.

Tabelle 5.

Versuchsreihe C.

(Stärke der Thiosulfatlösung: 1,0340 · n/70,05.)

| Versuchsnummer | Beim Titrieren wurde eine a ccm Thiosulfatlösung entsprechende Ammoniakmenge gefunden a | Die bei der Neßler-Bestimmung gefundene Ammoniakmenge entsprach | | Korrigierte Menge ca. n/70,05 Thiosulfatlösung a + b |
|--|--|---|--|---|
| | | n mg Stickstoff n | b ccm Thiosulfatlösung $b = n \cdot \frac{5}{1,0340}$ | |
| Ohne Eialbumin | | | | |
| 15 | 38,80 | 0,023 | 0,111 | 38,911 |
| 16 | 38,65 | 0,033 | 0,160 | 38,810 |
| 17 | 38,55 | 0,065 | 0,314 | 38,864 |
| 18 | 38,70 | 0,061 | 0,295 | 38,995 |
| Mittel | | | | 38,895 |
| 100 g Urlösung enthalten demnach 789,0 mg Ammoniakstickstoff | | | | |
| Mit einigem Eialbumin (22,66 mg Proteinstickstoff) | | | | |
| 19 | 38,75 | 0,046 | 0,222 | 38,972 |
| 20 | 38,75 | 0,060 | 0,290 | 39,040 |
| 21 | 38,75 | 0,043 | 0,208 | 38,958 |
| 22 | 38,75 | 0,052 | 0,251 | 39,001 |
| Mittel | | | | 38,993 ¹⁾ |

100 g Urlösung enthalten demnach 790,7 mg Ammoniakstickstoff.

¹⁾ Die Korrektion wegen des Ammoniakgehaltes der Albuminlösung beträgt hier 0,003 mg Ammoniakstickstoff, was 0,015 ccm der angewandten ca. n/70,05-Thiosulfatlösung entspricht.

Tabelle 5 (Fortsetzung).

| Versuchsnummer | Beim Titrieren wurde eine a ccm Thiosulfatlösung entsprechende Ammoniakmenge gefunden a | Die bei der Neßler-Bestimmung gefundene Ammoniakmenge entsprach | | Korrigierte Menge ca. $n/70,05$ Thiosulfatlösung a + b |
|---|--|---|---|---|
| | | n mg Stickstoff n | b ccm Thio sulfatlösung $b = n \cdot \frac{5}{1,0340}$ | |
| Mit viel Eialbumin (113,3 mg Proteinstickstoff) | | | | |
| 23 | 39,00 | 0,043 | 0,208 | 39,208 |
| 24 | 38,85 | 0,063 | 0,305 | 39,155 |
| 25 | 38,95 | 0,032 | 0,155 | 39,105 |
| 26 | 38,75 | 0,069 | 0,334 | 39,084 |
| Mittel | | | | 39,138 ¹⁾ |

100 g Urlösung enthalten demnach 792,5 mg Ammoniakstickstoff.

100 g der Urlösung enthalten also:

| | | | Ammoniakstickstoff |
|--|---|--------------------------|--------------------|
| Nach der ursprünglichen Bestimmung | | | 783,6 mg. |
| Versuchsreihe A | { | Ohne Eialbumin | 785,1 » |
| | | Mit » | 785,3 » |
| » B | { | Ohne » | 784,2 » |
| | | Mit » | 784,6 » |
| » C | { | Ohne » | 789,0 » |
| | | Mit einigem » | 790,7 » |
| | | Mit vielem » | 792,5 » |

Man ersieht hieraus, daß die Bestimmungen innerhalb jeder Versuchsreihe gegenseitig gut übereinstimmen, besser als die verschiedenen Versuchsreihen untereinander. Nun ist es im vorausgehenden mehrere Male erwähnt worden und soll hier nur eben hervorgehoben werden, daß gerade die gegenseitige Übereinstimmung der mit proteinfreien Lösungen einerseits und proteinhaltigen andererseits erhaltenen Analysenresultate für die uns hier beschäftigenden Untersuchungen von größtem Belang ist. Wenn aber auch die Abweichung innerhalb jeder Versuchsreihe die Grenzen des Versuchsfehlers kaum überschreiten, so macht sich jedoch eine deutliche Neigung in

¹⁾ Die Korrektion ist 0,015 mg Ammoniakstickstoff, 0,073 ccm Thio-sulfatlösung entsprechend.

der bestimmten Richtung geltend, daß die Bestimmung um so höher ausfällt, je größer die bei der Koagulation vorhandene Eieralbuminmenge im Verhältnis zum Ammoniak ist. Ob es sich hier nur um Versuchsfehler handelt, oder ob dieses Verhalten mit der Koagulation des Eieralbumins in irgend einem Zusammenhang steht, das läßt sich vorläufig noch nicht entscheiden, der Frage wird aber in einer folgenden Abhandlung, welche das Koagulationsproblem überhaupt behandelt, näher getreten werden.

Bezüglich der Übereinstimmung der einzelnen Versuchsreihen unter einander bemerkt man, daß A und B mit der ursprünglichen Bestimmung gut stimmen, indem die größte Abweichung vom Mittel (784,6 mg) hier nur etwa 1 : 800 beträgt. Größer wird der Versuchsfehler, wenn die zu bestimmende Menge Ammoniumsulfat, wie in der Reihe C, nur klein ist (etwa 8 mg Stickstoff). Bei der proteinfreien Lösung beträgt die Abweichung vom oben angeführten Mittel ungefähr $\frac{1}{2}\%$ und bei der proteinreichen Lösung sogar 1% .¹⁾ Liegen also nur kleine Ammoniakmengen zur Bestimmung vor, dann kann man auf eine größere absolute Genauigkeit als die oben gefundene kaum rechnen, aber auch in solchen Fällen wird der Fehler wahrscheinlich dasselbe Vorzeichen besitzen, wenn man Bestimmungen in proteinfreien und proteinhaltigen Lösungen zu gleicher Zeit und auf dieselbe Weise ausführt, dermaßen, daß der prozentische Fehler der Differenz zweier solchen Bestimmungen einigermaßen von derselben Größenordnung sein wird wie der Fehler der Einzelbestimmungen.

i) Kontrollversuche, die Bestimmung des Proteinstickstoffs betreffend.

Mit diesen Versuchen beabsichtigen wir den Einfluß zu beleuchten, welchen eine Variation verschiedener Einzelheiten unseres Verfahrens auf die Resultate ausübt.

¹⁾ Der in der Versuchsreihe C gefundene größere Wert des Stickstoffgehalts der Urlösung rührt nicht davon her, daß wir in dieser Reihe durch die Neßler-Bestimmungen die gefundene Ammoniakmenge vergrößert haben, denn auch die Einstellung der Thiosulfatlösung ist durch Neßler-Bestimmungen verschärft worden, wodurch ihr Titer entsprechend verkleinert wird.

Wir verwendeten eine Eieralbuminlösung, die durch sorgfältige Dialyse eines sechsmal krystallisierten Präparats mit nachfolgender Verdünnung mit Wasser dargestellt war und 0,64 mg Ammoniakstickstoff (bestimmt nach g) und 23—24 mg Proteinstickstoff in 10 ccm enthielt. Für jeden Versuch wurde 10 ccm (auf 0,01 ccm genau gemessen) angewendet. In der Mehrzahl der Versuche wurde der Gesamtstickstoff ermittelt, in einigen aber nur der Proteinstickstoff, indem das Albumin auskoagulierte, abfiltriert und gewaschen, wonächst der Stickstoffgehalt im Niederschlag nebst dem Filter bestimmt wurde; zu dem gefundenen Proteinstickstoff wurde 0,64 mg addiert, weshalb die in der Tabelle 6 (S. 73) mitgeteilten Zahlen auch für diese Versuche den Gesamtstickstoff angeben.

Sämtliche Versuchsreihen sind in der Tabelle 6 zusammengestellt. Die Bezeichnung Kj. des zweiten Stabes bedeutet, daß die Aufschließung wesentlich nach dem ursprünglichen Verfahren Kjeldahls ausgeführt ist, indem 10 ccm Albuminlösung in einem langhalsigen Jena-Kolben (250 ccm) nebst 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure und einem Stückchen Kupferdraht (etwa 50 mg) erhitzt worden sind. Ob außerdem ein wenig Kaliumsulfat zugegeben ist oder nicht, erhellt aus dem dritten Stab, während der vierte Stab angibt, wie lange gekocht worden ist über die Zeit (2—4 Stunden) hinaus, welche verlaufen ist, bevor die Flüssigkeit als Zeichen der im wesentlichen beendeten Aufschließung grün geworden ist. Der fünfte Stab der Tabelle gibt an, ob nach beendetem Sieden eine Oxydation mittels Permanganats stattgefunden hat oder nicht.

In den Reihen i, k, l und m ist das Albumin in der S. 59 angegebenen Weise koaguliert worden, und die Aufschließung des Niederschlags mittels Schwefelsäure ist nach Filtrieren und Waschen vorgenommen; in zwei dieser Reihen (k und m) haben wir 10 ccm konzentrierter Ammoniumsulfatlösung vor der Koagulation zugefügt, um zu probieren, inwiefern die Auswaschung auch in der Gegenwart so großer Mengen von Ammoniumsulfat Genüge leistet.

Die Bezeichnung Kj.-G. bedeutet, daß die Aufschließung

Tabelle 6.

Stickstoffbestimmungen im Eieralbumin nach der in verschiedenen Weisen modifizierten Kjeldahl-Methode.

| Ver- suchs- reihe | Der Name der Methode nebst Bemerkungen über die Ausführung | Variation von Einzelheiten der Methode | | | Anzahl der Ver- suche | Gefundene Stick- stoffmenge (mg) | |
|-------------------------|---|--|-------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| | | K ₂ SO ₄ ange- wend. (g) | Kochdauer | Oxydation mit KMnO ₄ | | Kleinst- u. größter Wert | Mittel- wert |
| a | Kj. | 0 | 1 Std. n. d. Grünfärbg. | keine Oxydat. | 4 | { 23,55 23,92 } | 23,76 |
| b | „ | 0 | 8 „ „ „ | „ | 4 | { 23,72 24,05 } | 23,90 |
| c | „ | 5 | 1 „ „ „ | „ | 4 | { 23,82 24,02 } | 23,94 |
| d | „ | 5 | 8 „ „ „ | „ | 4 | { 24,12 24,52 } | 24,35 |
| e | „ | 0 | 1 „ „ „ | Oxydation | 4 | { 24,32 24,43 } | 24,37 |
| f | „ | 0 | 8 „ „ „ | „ | 4 | { 24,36 24,48 } | 24,42 |
| g | „ | 5 | 1 „ „ „ | „ | 4 | { 24,43 24,46 } | 24,45 |
| h | „ | 5 | 8 „ „ „ | „ | 4 | { 24,43 24,53 } | 24,49 |
| i | Kj. Koagulation usw. | 5 | 2 „ „ „ | „ | 6 | { 24,10 24,48 } | 24,32 |
| k | Kj. Koagulation usw. nach dem Zusatz von 10 ccm konzentrierter Am ₂ SO ₄ -Lösung | 5 | 2 „ „ „ | „ | 6 | { 24,20 24,47 } | 24,39 |
| l | Kj. Koagulation usw. | 5 | 8 „ „ „ | „ | 6 | { 24,34 24,47 } | 24,42 |
| m | Kj. Koagulation usw. nach dem Zusatz von 10 ccm konzentrierter Am ₂ SO ₄ -Lösung | 5 | 8 „ „ „ | „ | 6 | { 24,30 24,47 } | 24,41 |
| n | Kj. | 5 | 5 „ „ „ | „ | 6 | { 24,27 24,39 } | 24,34 |
| o | Kj.-G. | 20 | 3 „ in allem | keine Oxydat. | 5 | { 23,46 24,22 } | 23,84 |
| p | Kj. G.-A. Doppeldestillation, das erste Mal unter Zusatz von Na ₂ S | 20 | 3 „ „ „ | „ | 4 | { 24,44 24,48 } | 24,47 |
| q | Kj. G.-A. Einzeldestillation mit Zusatz von Trauben- zucker | 20 | 3 „ „ „ | „ | 4 | { 24,32 24,42 } | 24,37 |

nach der Modifikation Gunnings ausgeführt ist; die 10 ccm Albuminlösung wurden $\frac{1}{2}$ Stunde mit 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure, einem Stückchen Kupferdraht und 5 g Kaliumsulfat erhitzt, sodann wurden weiter 15 g Kaliumsulfat zugegeben, und nachher das Erhitzen noch 2—2 $\frac{1}{2}$ Stunden fortgesetzt.

Mit Kj.-G.-A. bezeichnen wir, daß wir bei der Aufschließung nach der Abänderung Gunning-Arnolds verfahren sind, d. h. ganz wie nach dem Gunningschen Verfahren, nur außerdem noch mit Zusatz von $\frac{1}{2}$ g Merkurioxyd. Bei der Versuchsreihe p wurde das Ammoniak mittels einer Mischung von Natriumhydroxyd und Natriumsulfid abdestilliert, zu dem Destillat wurde ein wenig Kupfersulfat zugegeben, um die hier anwesenden Spuren von Schwefelwasserstoff zu binden, und dann noch einmal in der üblichen Weise destilliert. Bei der Reihe q wurde nur einmal mit Natron unter Zusatz von ein wenig Glukose destilliert. Die Glukose reduziert anwesende Quecksilberverbindungen zu metallischem Quecksilber; dieses letztere bequeme Verfahren verdanken wir dem Herrn Prof. Dr. Ivar Bang, Lund.

Aus der Tabelle ersieht man erstens, daß die Oxydation mittels Permanganat bei der Kjeldahl-Methode in seiner einfachsten Form nicht zu vermeiden ist (Reihe a, b, c und d); nur in der Reihe d, wo 5 g Kaliumsulfat zugesetzt worden ist, und wo das Sieden 8 Stunden, nachdem die Flüssigkeit grün war, fortgesetzt wurde, ist das Resultat richtig geworden, wenn auch einzelne der Bestimmungen sehr niedrig ausgefallen ist. Bezüglich der übrigen Reihen (e—n), wo das einfache Kjeldahl-Verfahren mit Oxydation mittels Permanganat angewandt wurde, darf das Resultat als durchaus befriedigend bezeichnet werden. Das Mittel der Durchschnittswerte der ermittelten Stickstoffmenge beträgt für diese Reihen 24,40 mg, und keiner der Durchschnittswerte weicht von diesem Mittel $\frac{1}{2}$ % ab. In zwei der Reihen (i und k) findet sich eine einzelne Bestimmung, welche ein ziemlich niedriges Resultat gegeben hat; vielleicht ist das dadurch verursacht, daß ein 2-stündliches Sieden, nachdem die Flüssigkeit grün geworden

ist, nicht immer ausreichend ist, vielleicht aber ist es nur ein Versuchsfehler.¹⁾

Aus den Versuchsreihen i, k, l und m erhellt erstens, daß das Eieralbumin durch die Koagulation vollständig gefällt wird²⁾ und in dieser Weise eben so genau zu ermitteln ist als durch die direkte Aufschließung, und zweitens, daß die Gegenwart reichlicher Mengen von Ammoniumsulfat ohne irgend einen Einfluß auf das Resultat ist.

Rücksichtlich des durch die Untersuchungen R. Koefoeds³⁾ nachgewiesenen, ziemlich reichlichen Stickstoffverlustes, der eintritt, wenn mit viel Kaliumsulfat erhitzt wird, haben wir bei den letzten drei Versuchsreihen eine Erhitzungsdauer von nur 3 Stunden benutzt. Aus der Reihe o ersieht man, daß Behandlung nach Gunning während 3 Stunden für die vollständige Aufschließung nicht ausreicht, indem die gefundenen Werte sämtlich mehr oder weniger zu niedrig sind. Bei der Gunning-Arnoldschen Modifikation dagegen geht die Aufschließung — was auch zu erwarten war — in 3 Stunden glatt zu Ende, der gefundene Wert des Stickstoffgehalts steht in gutem Einklang mit demjenigen der Reihen e—n und gewährt ihnen somit eine Stütze.

Auf der Grundlage dieser Versuche, welche ganz und gar die hier im Laboratorium im Laufe der Zeit geernteten Erfahrungen bestätigen, haben wir das oben unter a) und b) (S. 59) beschriebene Verfahren zur Bestimmung des Proteinstickstoffs gewählt. Daß wir dieses Verfahren dem etwas

¹⁾ Wir haben bei den zahlreichen Analysen, die wir im Laufe der Jahre ausgeführt haben, gesehen, daß es sich mitunter ereignet, daß vereinzelte Bestimmungen trotz aller Sorgfalt zu niedrig ausfallen. Es ist deshalb von Belang gewesen, daß wir für jede Analyse gewöhnlich wenigstens drei Bestimmungen gemacht haben, und demzufolge imstande gewesen sind, einen einzelnen niedrigen Wert außer Betracht zu lassen.

²⁾ In zwei der Versuche wurde nach dem unter c, S. 60 angegebenen Verfahren untersucht, ob nicht koagulables Protein im Filtrate vom koagulierten Albumin nachzuweisen war, das Filtrat war aber nach der Abdestillation des Ammoniaks ganz stickstofffrei.

³⁾ Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, Bd. 10, S. 52 (1911).

schnelleren Gunning-Arnoldschen vorziehen, hat seinen Grund darin, daß man bei diesem letzteren, wie es von R. Koefoed nachgewiesen worden ist,¹⁾ eher als bei dem von uns befolgten Verfahren einem Stickstoffverlust ausgesetzt ist, weil die Temperatur der Aufschließungsflüssigkeit des größeren Kaliumsulfatgehalts wegen eine höhere ist. Aus den Versuchen von R. Koefoed erhellt es ja nämlich, daß Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl immer zu niedrig ausfallen müssen, und zwar weil selbst reines Ammoniumsulfat durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure Stickstoff abgibt — unsicher in welcher Form — und desto mehr je höher die Temperatur und je länger die Dauer des Erhitzens sind. Eine Erhitzungsdauer von 6 Stunden gab bei einer üblichen Kjeldahl-Bestimmung einen Verlust von $\frac{1}{3}\%$ des Gesamtstickstoffs, und ein 24-stündiges Erhitzen gab den doppelten Verlust. Bei unserm Verfahren meinen wir deshalb mit einem Verlust von etwa $\frac{1}{2}\%$ des Gesamtstickstoffs rechnen zu müssen.

Die meisten der in den folgenden Abhandlungen beschriebenen Untersuchungen sind vergleichender Natur, weshalb die absolute Konzentration des Proteins von untergeordneter Bedeutung ist, und die bei der Stickstoffbestimmung begangenen Fehler, die infolge der stetigen Anwendung desselben Verfahrens immer von derselben Größenordnung ist, keine nennenswerte Rolle spielen. Wird dagegen von der Bestimmung irgend einer Konstante die Rede, dann ist der obenerwähnte Fehler der Methode nicht zu vernachlässigen. Selbstverständlich muß man die gefundenen Werte des Proteinstickstoffs bei der Berechnung benutzen, bei der Beurteilung der solchermaßen berechneten Größe muß man sich aber erinnern, daß der benutzte Wert des Proteinstickstoffs wahrscheinlich um etwa $\frac{1}{2}\%$ zu niedrig ist.

Übersicht.

Abschnitt A.

1. Das Verfahren, nach welchem man das Eialbumin von Asche, Mucoïd und Konalbumin reinigt, wird beschrieben,

¹⁾ l. c.

und es wird auseinandergesetzt, wie man die Fortschritte quantitativ verfolgen kann, welche die Reinigung des Eieralbumins durch wiederholtes Krystallisieren und Waschen macht.

2. Es wird gezeigt, daß man ohne jegliche Schwierigkeiten das Eieralbumin von Asche, Mucoïd und Konalbumin reinigen kann, indem nach 3 Krystallisationen mit zugehörigen Waschungen keine dieser Verunreinigungen in nennenswerten Mengen im Eieralbumin vorhanden sind. Da das gesamte Ausgangsmaterial unserer in den folgenden Abhandlungen beschriebenen Versuche aus Eieralbumin erhalten ist, welches wenigstens 6 mal krystallisiert ist, dürfen wir es daher als von den genannten Verunreinigungen frei betrachten.

3. Das reinste Ammoniumsulfat des Handels enthält gewöhnlich leicht nachweisbare Aschenmengen. Solche Präparate sind bei der vollständigen Reinigung des Eieralbumins nicht zu gebrauchen, und zwar besonders nicht bei den letzten Krystallisationen und Waschungen; dabei können nur Lösungen von mit besonderer Sorgfalt gereinigtem, möglichst aschenfreiem Ammoniumsulfat benutzt werden.

4. Auch das reinste Eieralbumin hinterläßt in einer Platinschale einen winzigen Glührückstand, der nicht von Verunreinigungen, sondern vom Phosphorgehalt des Eieralbumins stammt.

Abschnitt B.

1. Es wird eine ausführliche Beschreibung eines Dialysierapparates gegeben, welcher aus 6 Dialysierzellen besteht, deren wesentlichster Bestandteil ein Kolloidumhäutchen ist. Dieses Häutchen ist für Wasser und Ammoniumsulfat durchlässig, dagegen aber fürs Eieralbumin undurchlässig. Der Apparat ist derart eingerichtet, daß man bei der Dialyse der Eieralbuminlösung auf der «Außenflüssigkeit» (dem Wasser) einen Minderdruck etablieren kann, wodurch der osmotische Druck der «Innenflüssigkeit» derart kompensiert wird, daß einer Verdünnung der letzteren durch Einsaugen von Wasser vorgebeugt wird.

2. Mittels dieses Apparats ist es möglich, jede Spur von Schwefelsäure und weit den wesentlichsten Teil des Ammoniaks aus ammoniumsulfathaltigen Eieralbuminlösungen zu entfernen; die dialysierte Flüssigkeit kann nach sorgfältiger Analyse zur Darstellung von Eieralbuminlösungen mit wohldefinierter Zusammensetzung dienen.

3. Wenn durch Mischung mit reichlichem Toluol, oft wiederholtes Schütteln und Aufbewahrung in Eis in einem Eisschrank eine Eieralbuminlösung gegen die Wirksamkeit der Mikroorganismen geschützt wird, so bewahrt dieselbe die für den betreffenden Proteinstoff charakteristischen Eigenschaften unverändert nach Monaten.

Abschnitt C.

Wird eine Eieralbuminlösung mit Ammoniumsulfat gefällt und der auskrystallisierte Niederschlag abfiltriert, so kann man auf Grundlage von Analysen des Filtrats einerseits und der Krystalle mit anhaftender Mutterlauge andererseits gewisse Folgerungen über die Zusammensetzung der Krystalle ziehen. Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens, dem wir den Namen «die Proportionalitätsmethode» gegeben haben, wird mit Bezug auf das hier genannte Beispiel einer eingehenden Behandlung unterzogen, und es wird nachgewiesen, daß dasselbe Prinzip sich in mannigfaltigen andern Fällen benutzen läßt; besonders betont wird die Bedeutung, die die Methode bei den Untersuchungen von kolloiden Lösungen erlangt. Ist nämlich eine kolloide Lösung durch ein halbdurchlässiges Häutchen von dem reinen Dispersionsmittel derselben getrennt, indem zu gleicher Zeit Diffusionsgleichgewicht und osmotisches Gleichgewicht zwischen den beiden Flüssigkeiten bestehen, dann läßt sich das System ganz wie oben beschrieben behandeln, indem das reine Dispersionsmittel dem Filtrat und die kolloide Lösung den Krystallen mit anhaftender Mutterlauge entspricht.

Abschnitt D.

Es wird eine eingehende Beschreibung der Stickstoffbestimmungsmethoden gegeben, die in dieser und den

folgenden Arbeiten zur Anwendung gekommen sind, und es wird über eine Reihe von Kontrollversuchen berichtet, die zur Bestimmung der Genauigkeit der Analysenmethoden ausgeführt sind.

Januar 1916.
