

617. Erich Harnack: Studien über das sogenannte aschefreie Eialbumin.

(Eingegangen am 16. December.)

Vor einiger Zeit habe ich an dieser Stelle¹⁾ auf ein Verfahren hingewiesen, durch welches es gelingt, das Albumin des Hühnereies von den mit ihm verbundenen anorganischen Basen und basischen Salzen zu befreien und so die Eigenschaften des unverbundenen Albumins eingehender zu erforschen. In Folge jener Mittheilungen sind mir so zahlreiche Anfragen von den verschiedensten Seiten her zugegangen, dass ich an dieser Stelle nicht nur über die weiteren Ergebnisse meiner Studien in Bezug auf den genannten Gegenstand berichten, sondern auch einige Punkte, die in jenen kurz gefassten Mittheilungen vielleicht nicht in genügend helles Licht gerückt wurden, etwas schärfer beleuchten will.

Was zuvörderst das Herstellungsverfahren anlangt, so kann dasselbe ja im Einzelnen gewisse Schwierigkeiten verursachen, obgleich über das sehr einfache Princip des Verfahrens durchaus kein Zweifel obwalten kann. Das Albumin ist eine Säure, worüber man ja im Grunde längst schon im Klaren ist²⁾, was sich aber jetzt auch insofern sicher erweisen lässt, als das freie, unverbundene Albumin amphigen reagirendes Lakmuspapier deutlich röthet. Ob diese Reaction auf directem oder indirectem Wege zu Stande kommt, ist principiell ganz gleichgültig.

Das Albumin gleicht darin zahllosen, complicirt zusammengesetzten organischen Säuren, dass seine Salze mit Alkalien in Wasser auch bei Gegenwart von Neutralsalzen löslich sind, die Salze mit schweren Metallen dagegen nicht; es unterscheidet sich von jener nur dadurch, dass die freie Säure sich in Wasser zu lösen scheint. Aber es handelt sich hierbei nicht um eine wirkliche Lösung, sondern nur um eine hochgradige Quellung, die sofort unmöglich wird, sobald man irgend ein völlig neutrales Salz in dem Wasser auflöst oder letzteres durch Salzsäure u. s. w. ansäuert. In dem Hühnereiweiss findet sich das Albumin als basisches Salz, in Verbindung mit einem Ueberschuss von Basen, insbesondere von alkalischen Erden. Aus dieser Verbindung durch Behandeln derselben mit stärkeren Säuren das freie Albumin direct abzuschneiden, ist nicht wohl möglich, weil das mit Basen verbundene Albumin durch stärkere Säuren, ähnlich wie durch

¹⁾ Diese Berichte XXII, 1889, S. 3046; XXIII, 1890, S. 40.

²⁾ Es sei hier nur die Beobachtung von Hoppe-Seyler und Sertoli erwähnt, wonach das Eiweiss im Vacuum aus Natriummonocarbonat ein wenig Kohlensäure austreibt. (Medicin. chem. Untersuchungen, Berlin 1868, III, S. 350.

Siedhitze, zur Gerinnung gebracht, in die sogenannte unlösliche Modification verwandelt wird, während es durch die Einwirkung von Säuren bei höherer Temperatur die Umwandlung in Acidalbumin, Pepton usw. erleidet. Man muss daher zur Abscheidung des freien Albumins gewissermassen auf einem Umwege vorgehen, und das ist es, was bei dem von mir gewählten Verfahren bezweckt wurde. Es wird dabei zunächst eine Verbindung des Albumins mit Kupfer¹⁾ hergestellt, diese durch starkes Alkali zerlegt und sodann durch Uebersäuern das freie Albumin gefällt. Man hat dabei im Allgemeinen auf dreierlei zu achten: einmal dass während der ganzen Procedur das Albumin nicht gelatinire oder gar in die geronnene Modification durchgeführt werde, sodann dass keine Umwandlung des Albumins in Alkalialbuminat oder Acidalbumin stattfinde, und endlich dass die Verbindung von Albumin und Kupfer durch Alkali auch vollständig zerlegt werde.

Ich pflege auf einmal das Weisse von etwa 10—12 Eiern zu verarbeiten: nachdem es sorgfältig zerschnitten, wird es ein wenig mit Wasser verdünnt und stark verdünnte Essigsäure in mässigem Ueberschusse zugefügt, bis die Globuline sich vollständig ausgeschieden haben. Man verwende hier ja keine zu starke Säure, da sonst die ganze Albuminlösung gelatiniren kann. Sodann wird durch ein Sternfilter filtrirt, was bei bestem starken Filtrirpapier (Schleicher & Schüll No. 598) rasch von Statten geht, wenn man ein recht geräumiges Filter anfertigt und nicht Alles auf einmal aufgiesst, sondern immer nur bis zu $\frac{1}{4}$ oder $\frac{1}{3}$ das Filter füllt und abwartet, bis der grösste Theil der Flüssigkeit abgeflossen ist. Das völlig klare Filtrat wird mit kalt gesättigter Sodalösung überneutralisirt und mit kalt gesättigter Kupfersulfatlösung in nicht zu geringer Menge versetzt. Sollte nicht sogleich ein feinflockiger, hellgrüner Niederschlag entstehen, so ist die Reaction zu sauer; man fügt daher gesättigte Sodalösung langsam hinzu, bis jener Niederschlag in reichlicher Menge sich ausscheidet. Er setzt sich langsam ab, weil er äusserst fein vertheilt ist, aber durch das Abfiltriren einer Probe ist leicht der Nachweis zu führen, ob aus dem Filtrate durch weiteren Soda- oder Kupferzusatz noch etwas auszufällen ist. Mit gefällttem Kupferoxydhydrat kann der Niederschlag nach seiner ganzen Beschaffenheit gar nicht verwechselt werden, zumal er sich in überschüssigem Alkali mit tiefvioletter Farbe löst. Jener Niederschlag wird nun auf glattem Filter völlig ausgewaschen, d. h. bis das Filtrat durch gelbes Blutlaugensalz nicht mehr braun gefärbt wird, was nicht allzu viel Zeit erfordert. Hierauf wird der Niederschlag in einem Gefässe wieder mit Wasser verrührt und

¹⁾ vgl. meine Untersuchungen über die Kupferverbindungen des Albumins Zeitschr. für physiolog. Chemie, Band V, S. 198.

nur soviel verdünnte Kalilauge zugesetzt, als erforderlich ist, um das Ganze zu einer dunkel-violetten Flüssigkeit zu lösen. Ist das geschehen, so wird durch vorsichtiges Neutralisiren mit verdünnter Essigsäure der Niederschlag wieder hervorgerufen. Dieselbe Procedur des Lösens und Wiederfällens kann noch ein- oder zweimal wiederholt werden. Bringt man jetzt den Niederschlag wieder aufs Filter, so bemerkt man meist, dass das Filtrat stark kupferhaltig ist, ohne dass es Eiweiss enthielte. Es bestand also vorher ein kupferreicheres Albuminat, und das Alkali hat aus demselben einen Theil des Kupfers verdrängt, sodass nunmehr das kupferärmste Albuminat (mit ca. 1.35 pCt. Cu) nachgeblieben ist, welches indess ganz dasselbe Aussehen besitzt. Dieser Niederschlag wird auf glattem Filter wieder vollständig ausgewaschen, und man überzeugt sich dann leicht durch eine quantitative Probe, dass er beim Verbrennen reines Kupferoxyd ohne andere Aschenbeimengung hinterlässt. Nunmehr bringt man den feuchten Niederschlag in eine Schale, verreibt ihn gleichmässig mit etwas Wasser und fügt starke Kalilauge in nicht zu geringer Menge hinzu.

Das Ganze wird dadurch in eine dunkelviolette Gallerte und sodann in eine ebenso gefärbte Lösung verwandelt, welche dickflüssig, aber meist völlig klar ist. Anderenfalls kann man sie filtriren, was sich freilich etwas langsam vollzieht. Diese Lösung bleibt an einem kühlen Orte etwa 24 Stunden stehen. Das starke Alkali hat allmählich die Verbindung von Kupfer und Eiweiss getrennt, ohne dass Kupferoxydhydrat sichtbar zur Ausscheidung gebracht wird. Es ist, als ob Kupfer und Eiweiss sich noch in einer überaus lockeren Verbindung befänden, und neutralisirt man jetzt alle Base mit mässig verdünnter Salzsäure und fügt noch einen Ueberschuss davon zu, so fällt das reine freie Albumin in derben weissen Flocken, während das Filtrat alles Kupfer als Chlorkupfer gelöst enthält. Die Hauptsache ist, dass man zur Zerlegung des Kupferalbuminats nicht zu schwache Kalilauge nimmt: Die Zerlegung findet sonst nicht vollständig genug statt, es bleibt doch noch ein kleiner Rest des Kupfers mit dem Albumin in fester Verbindung und das durch Salzsäure Gefällte ist zwar nahezu farblos, besitzt aber doch nicht die Eigenschaften des freien Albumins.

Hat man nun das letztere ausgefällt, so wäscht man es auf glattem Filter anfangs mit etwas angesäuertem, später mit reinem Wasser vollkommen aus, wobei der Niederschlag mehr und mehr quillt und schliesslich auch sich lösen und durch das Filter laufen kann. Letzteres ist aber ein Beweis, dass der Niederschlag wirklich aus freiem Albumin besteht, und es gelingt doch, wenn man nicht zu geringe Mengen in Arbeit nimmt, ihn nahezu vollständig auszuwaschen, ohne einen allzu grossen Verlust zu erleiden. Wenn auch eine Spur Asche (höchstens

1 pro Mille) zurückbleiben sollte, die dann fast ausschliesslich aus Chlorkalium besteht, so ist dies ganz ohne Belang. Man überzeuge sich nur, dass die Substanz beim Kochen mit Wasser eine klare Lösung giebt, die auch beim Vermischen mit Alkohol vollkommen klar bleibt, während durch den Zusatz eines Neutralsalzes oder einer verdünnten Mineralsäure sofort ein reichlicher feinflockiger Niederschlag erfolgt. Hierdurch, sowie in der vollständigen Verbrennbarkeit unter Hinterlassung eines kaum sichtbaren Ascheanfluges sind die Hauptunterschiede in den Eigenschaften gegenüber dem ursprünglichen, d. h. dem mit Basen verbundenen Albumin des Eihühnereies gegeben.

Erhitzt man das noch feuchte Albumin, so schmilzt es in Wasser, und erst bei weiterem Erhitzen tritt allmählich Zersetzung der geschmolzenen Substanz ein. Kocht man die wässrige Lösung einige Zeit, so giebt sie die bekannte Peptonreaction. Weitere Versuche, das Albumin zu zersetzen, habe ich bisher noch nicht ausgeführt. Dagegen bin ich bemüht gewesen, Verbindungen des Albumins im krystallisirten Zustande zu erhalten. In dieser Hinsicht habe ich bisher nur die Erfahrungen von Hofmeister¹⁾ zu bestätigen vermocht. Es ist mir ohne besondere Schwierigkeit gelungen, schön krystallisirte Verbindungen des Albumins mit schwefelsaurem Ammon in gut ausgebildeten Tafeln und Säulen zu erhalten, aber diese Verbindungen sind alle sehr eiweissarm, sie enthalten nur etwa 5 pCt. Albumin. Eiweissreichere habe ich bisher immer nur amorph erhalten, ebenso das reine Albumin, obgleich ich mich vielfach bemüht habe, dasselbe z. B. aus mit Alkohol und Chlor versetzten wässrigen Lösungen krystallisirt zu gewinnen. Für die Herstellung der Verbindungen des Albumins mit schwefelsaurem Ammon besteht die Schwierigkeit, dass die wässrige Lösung des freien Albumins, wenn sie nicht gar zu verdünnt ist, durch schwefelsaures Ammoniak wie durch alle Neutralsalze gefällt wird. Zusatz von Aetzammoniak, wie von Alkalien, verhindert die Fällung. Man braucht die Hoffnung auf ein günstiges Resultat fortgesetzter Bemühungen noch keineswegs aufzugeben.

Dass sich die sauren Eigenschaften des freien Albumins leicht mit Hilfe von Lakmus constatiren lassen, habe ich oben bereits erwähnt. Den Beweis, dass es sich wirklich um Albumin und nicht um ein chemisches Umwandlungsproduct desselben handelt, habe ich in meinen oben citirten Publicationen bereits zu führen gesucht; ich darf auf jene verweisen und auf eine Wiederholung der Argumente verzichten.

Bei der fundamentalen Bedeutung des Eiweiss für den Lebensprozess und für die chemische Zusammensetzung jedes lebenden Ge-

¹⁾ Hofmeister, Zeitschrift für physiolog. Chem. XIV, S. 165.

bildes müssen in physiologischer Hinsicht namentlich die Lösungsverhältnisse des Albumins von allergrösstem Interesse sein. Wichtig ist hier vor allem die Thatsache, dass das freie, mit sauren Eigenschaften begabte Albumin der Quellung in reinem destillirten Wasser in vollkommener Weise fähig ist und daher eine scheinbare Lösung bildet. Erwärmen begünstigt diesen Vorgang der Quellung: das freie Albumin ist in destillirtem Wasser schmelzbar. Aus jener scheinbaren Lösung wird es aber ähnlich so manchen anorganischen »Colloiden« durch Neutralsalzlösungen und durch die meisten Mineralsäuren gefällt, unlöslich im Ueberschuss des Füllungsmittels. Das ist die zweite physiologisch wichtige Thatsache. Von Mineralsäuren fallen insbesondere: Salpetersäure, Salzsäure, Schwefelsäure, Metaphosphorsäure, dagegen Orthophosphorsäure nicht. Zahlreiche organische Säuren, die ich prüfte, fallen ebenfalls nicht, z. B. Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure, Weinsäure, Citronensäure. Auch die Gerbsäure ruft keine Fällung hervor. Bei den oben genannten Fällungen findet indess nicht etwa eine chemische Veränderung des Albumins statt, keine Ueberführung in »unlösliche Modification«, vielmehr ist der Niederschlag immer wieder, wenn man ihn abfiltrirt und auswäscht, in destillirtem Wasser »löslich«. Anders liegt die Sache dagegen, wenn man das Salz eines schweren Metalles in Lösung hinzufügt: hier wird in der That eine Verbindung des Albumins mit dem Metall gefällt, löslich in freien Säuren u. s. w. Auf der Wiederzerlegung einer solchen Verbindung beruht eben das von mir angewendete Verfahren zur Gewinnung freien Albumins.

Die Fällbarkeit des freien Albumins aus seiner wässrigen »Lösung« durch Neutralsalze oder Säuren wird durch Alkalien aufgehoben: versetzt man die Lösung zuvor mit Alkali, so fällen Neutralsalze nicht mehr, resp. Säuren erst nach vollzogener Neutralisation des Alkalis.

Dies ist die dritte in physiologischer Hinsicht jedenfalls hochwichtige Thatsache. Die Annahme liegt sehr nahe, dass durch die Vereinigung des an sich sauren Eiweisskörpers mit anorganischen Basen überhaupt erst eine wichtige Bedingung zum Zustandekommen der Lebensthätigkeiten gegeben sei, d. h. durch eine Verbindung des Albumins mit einem Ueberschuss von Basen hat jenes erst die Möglichkeit gewonnen, seine Aufgaben als lebendes Eiweiss zu erfüllen; denn es würde ja durch jedes Neutralsalz aus seinen Quellungen gefällt werden oder vielmehr gar nicht im Stande sein, in Lösungen solcher Stoffe zu quellen. Die Basen schützen also das Albumin nach verschiedenen Richtungen hin und gestatten ihm gewissermassen die Ausführung seiner vitalen Functionen, d. h. die Beibehaltung seiner für die Lebensthätigkeit unentbehrlichen Eigenschaften unter verschiedenen chemischen Bedingungen.

Durch seine Vereinigung mit Basen wird demnach das Albumin in gewissem Sinne löslicher gemacht, oder richtiger gesagt, geneigter, den gelösten (gequollenen) Zustand beizubehalten. Ganz im Gegensatz hierzu gewinnt es durch seine Verbindung mit Basen zugleich die Eigenschaft, durch Einwirkung höherer Temperatur nicht zu schmelzen, sondern in ungelösten und unlöslichen Zustand überzugehen. Das Gleiche geschieht auch durch gewisse chemische Einwirkungen (Alkohol, stärkere Säuren u. s. w.). Das Verständniss für den Vorgang fehlt uns noch vollständig. In dieser unlöslichen, geronnenen Modification ist das Eiweiss zwar todt und für immer lebensunfähig, aber es vermag für benachbartes lebendes Gewebe einen Schutz gegen physikalische und chemische Einflüsse zu gewähren. Würde lebendes Eiweiss, wie das freie Albumin, durch die Wärme schmelzen, so würde sich der lebenszerstörende Einfluss hoher Temperatur immer weiter und weiter geltend machen.

Derartige Vorgänge der Gerinnung, d. h. des Ueberganges aus dem gequollenen in den ungelösten Zustand unter Veränderung der Beschaffenheit des Eiweisskörpers dürfen mit der Ausfällung des freien Albumins aus seiner wässrigen »Lösung« durch ein Neutralsalz oder eine Mineralsäure nicht identificirt werden; denn das Albumin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Wie weit bei diesen Fällungen von der Bildung einer überaus lockeren molecularen Verbindung des Albumins mit dem Fällungsmittel gesprochen werden darf, mag dahingestellt bleiben; jedenfalls wird das Molekül des Albumins dabei nicht verändert. Es handelt sich also hier mehr um eine Zustandsveränderung, dort um eine Zustands- und Qualitätsveränderung, d. h. es ist hier ein physikalischer, dort ein physikalischer und chemischer Process. Dieser letztere aber ist es, der uns das Verständniss für gewisse Gerinnungsvorgänge, namentlich für solche, die wir als Prozesse des Absterbens anzusehen haben, so sehr erschwert. Dass ein Eiweisskörper aus dem »gelösten« Zustande unter veränderten Bedingungen in den geronnenen übergeht, kann an sich nicht Wunder nehmen, da die Eiweisskörper überhaupt hierzu unter sehr verschiedenen Umständen geneigt sind, aber die Frage, welche Factoren die chemische Veränderung der Eiweisssubstanz bedingen und worin die Veränderung besteht, diese Frage ist es eben, deren Beantwortung uns für die Erklärung der Vorgänge der Blutgerinnung, Todtenstarre etc. so grosse Schwierigkeiten verursacht. So lange wir noch nicht wissen, was mit dem Eialbumin vor sich geht, wenn es durch Siedhitze zur Gerinnung gebracht oder durch Alkohol gefällt wird, und warum das freie Albumin dieser Veränderung nicht fähig ist, so lange haben wir wenig Aussicht, für die bei jenen Gerinnungsprocessen unter überaus complicirten chemischen Verhältnissen betheiligten Eiweissstoffe die obige Frage zu beantworten, mag auch die Annahme, dass es sich hierbei

um fermentativ eingeleitete Spaltungen des ursprünglichen Eiweissmoleküls handle, als ganz plausibel erscheinen. Aber es gehen im Organismus sicherlich auch Prozesse vor sich, bei denen Eiweisskörper ohne Aenderung ihrer chemischen Beschaffenheit aus dem gequollenen in den ungelösten Zustand übergehen und aus letzterem rasch wieder in den ersteren zurückkehren. Das sind keine Prozesse des Absterbens, sondern physiologische Vorgänge, und unter diesen ist am auffallendsten das Verhalten des Muskels beim Wechsel des contractirten und erschlafften Zustandes. Dass der Vorgang der Contraction des Muskels auf dem plötzlichen Uebergang des im Faserinhalt enthaltenen Eiweisskörpers aus dem gequollenen in den ungelösten Zustand, die Wiedererschaffung auf dem umgekehrten Process beruhe, kann einem Zweifel kaum mehr unterliegen. Die Ursache für diesen Wechsel bildet wahrscheinlich die plötzliche Veränderung der chemischen Bedingungen. Hier haben wir, soweit von einer Analogie zwischen einem vitalen und einem physikalischen Vorgange die Rede sein kann, eine ganz auffallende Analogie zu dem Verhalten der »Lösungen« des freien Albumins: Zusatz des Neutralsalzes oder der Mineralsäure bewirkt die Fällung, Wiederentfernung beider die Wiederauflösung. Ich habe z. B. den Versuch in folgender Weise angestellt: in einen Dialysator bringe ich die Lösung des freien Albumins und rufe durch Salzsäure den Niederschlag hervor. Lasse ich nun gegen Wasser diffundiren, so verschwindet der Niederschlag allmählich wieder, und nach einiger Zeit ist alles Albumin wieder klar »gelöst«. Der Versuch lässt sich zunächst durch Eingiessen von Salzsäure in den Dialysator immer wieder aufs Neue wiederholen; allmählich wird aber das Albumin in Acidalbumin verwandelt und seine Fällbarkeit durch Salzsäure nimmt mehr und mehr ab. Dieses unzweideutige Resultat zeigt unzweifelhaft, dass bei der Fällung eine chemische Umwandlung des freien Albumins nicht eintritt und dass die Rückkehr in den früheren Zustand sofort wieder erfolgt, sobald nur das Mittel, welches die Aenderung des physikalischen Zustandes hervorruft, wieder weggeschafft ist. Wie weit die Analogie zu den in dem Inhalt der Muskelfasern sich abspielenden Vorgängen zutreffend ist, werden weitere Untersuchungen zu entscheiden haben. Dass ich weit davon entfernt bin, damit etwa einen Erklärungsversuch für den physiologischen Vorgang geben zu wollen, bedarf wohl nicht erst der Versicherung. Das freie Albumin besitzt auch im feuchten Zustande keine Neigung zu faulen: es trocknet, sich selbst überlassen, entweder ein zu einer gelben, durchsichtigen, spröden, leimartigen, pulverisirbaren Masse oder es kann unter günstigen Bedingungen auch schimmeln, aber zum Faulen habe ich es nicht bringen können, selbst nicht bei Zusatz von Pancreasferment. Es ist in hohem Grade bemerkenswerth, dass das Eiweiss auch diese für die Erfüllung seiner vitalen Eigenschaften un-

umgänglich nothwendige Eigenschaft, die Spaltbarkeit durch den Einfluss gewisser niederer Organismen, erst nach seiner Vereinigung mit Basen gewinnt. Ob sich das freie Albumin im feuchten Zustande in Folge dieser Widerstandsfähigkeit vielleicht zur Züchtung gewisser Reinculturen eignen wird, das werden Versuche lehren, deren Ausföhrung ich bereits angeregt habe. Da die niederen Organismen zu ihrer Vermehrung wohl eines Nährmaterials bedürfen, welches auch gewisse anorganische Salze enthält, so ist es eigentlich nicht wahrscheinlich, dass das freie Albumin hierfür geeignet sein kann. Indess sind die letzten Spuren von Salzen doch wohl nicht anz zu entfernen.

Halle, im December 1890.

618. Br. Pawlewski: Ueber Einfluss des Druckes auf Dissociation.

(Eingegangen am 15. December.)

Vor einigen Jahren habe ich dargethan, dass die kritische Temperatur eines Flüssigkeitsgemisches ausgedrückt werden kann durch die Gleichung ¹⁾:

$$T_m = \frac{nT + (100-n)T'}{100},$$

worin T_m die kritische Temperatur des zu untersuchenden Flüssigkeitsgemisches, T und T' kritische Temperaturen der einzelnen Bestandtheile und n und $100-n$ Procente derselben bedeuten.

Die Gültigkeit dieser Formel habe ich für einige Gemische bewiesen ²⁾, zu denselben Resultaten gelangte gleichzeitig auch O. E. Strauss ³⁾, zu angenäherten Ramsay ⁴⁾ noch vor mir; dagegen erzielte Ansdell ⁵⁾ verschiedene Resultate für Gasgemische und neuerdings Galitzine ⁶⁾ für Gemische von Aether mit Aceton und Aether mit Schwefelkohlenstoff. Die beiden letzteren Gelehrten erhielten niedrigere Werthe für T_m , als meiner Gleichung entsprochen hätte.

Indem ich vorläufig die Erklärung dieses Widerspruches einer weiteren Anhäufung des Versuchsmaterials anheimstelle, beabsichtige ich nachstehend die Mittheilung einiger Versuche, welche die Bestätigung der mitgetheilten Formel zum Zwecke hatten.

Wenn die oben mitgetheilte Gleichung richtig ist, so können auf Grund dessen folgende Schlüsse gezogen werden:

¹⁾ Diese Berichte XV, 461.

³⁾ Wiedemann's Beibl. 6, 282.

⁵⁾ Proc. Roy. Soc. 34, 113.

²⁾ Kosmos 1882, p. 16.

⁴⁾ Proc. Roy. Soc. 31, 194.

⁶⁾ Wiedemann's Ann. 41, 624.