

Die chemische Dialyse unter Anwendung von Chloroformwasser oder Aether und ihre Bedeutung für die chemische Analyse eiweisshaltiger Substanzen aus dem Thier- und Pflanzenreich;

von

Heinrich Struve.

Die chemische Dialyse ist in den letzten Jahren in verschiedenartigster Weise zu eingehenden Studien über die Eiweissstoffe herangezogen worden, doch nicht mit Glück, indem die durch dieselbe gewonnenen Resultate durchaus nicht den Erwartungen entsprachen. An diesem Nichterfolg trägt aber nicht die Dialyse an und für sich die Schuld, sondern einzig und allein die Unzulänglichkeit der Bedingungen, unter welchen sie in jedem einzelnen Falle ausgeführt wurde. Untersuchen wir dieselben näher, so lassen sie sich auf drei Ursachen zurückführen, nämlich: 1) auf die leichte Zersetzbarkeit der Substanzen, 2) auf die Benutzung des Pergamentpapiers, und 3) auf die Schwierigkeiten der Untersuchung der durch den Dialysator ausgetretenen Substanzen.

Um dem ersten Einwurf, dessen sich alle Experimentatoren bewusst waren, nach Möglichkeit vorzubeugen, wurde die chemische Dialyse bei möglichst niedriger Temperatur, in kürzester Zeit und unter häufiger Erneuerung der Aussenflüssigkeit und des Pergamentpapiers ausgeführt. Dadurch versetzte man sich aber in directe Abhängigkeit von der Temperatur und Zeit und war somit nie Herr des Versuchs. In Bezug des Pergamentpapiers ist nur hervorzuheben, dass ein Jeder, der dialytische Versuche unternommen und durchgeführt hat, die Schwierigkeiten kennt, um im Besitz eines guten, immer gleichartigen Pergamentpapiers zu sein. Das beste derartige Papier erhielt man bisher aus London und gab demselben den unbedingten Vorzug vor dem deutschen Fabrikate. Aber selbst das englische Pergamentpapier bot

keine hinreichende Garantie, zumal wo es galt, grosse Oberflächen herzustellen. Erwägt man nun noch die leichte Zerreibbarkeit eines solchen Papiers, daher die Nothwendigkeit des häufigen Erneuerns desselben, und dass man ausserdem nur mit kleinen Flüssigkeitsmengen und unter möglichster Vermeidung von Druckerscheinungen experimentiren musste, so kann man sich nicht genug über die Beharrlichkeit wundern, mit welcher an der Benutzung des Pergamentpapiers festgehalten wurde.

Der letzte erhobene Vorwurf ist eine natürliche Folge der beiden ersteren. Bei dem häufigen Wechsel der äusseren Flüssigkeit erhielt man rasch hinter einander überaus verdünnte Lösungen der diffundirten Substanzen, die ein ferneres, eingehenderes Untersuchen derselben beschwerlich, ja man kann sagen, unmöglich machten. Ausserdem war in den meisten Fällen bei derartigen Untersuchungen die Hauptaufmerksamkeit auf die Erscheinungen, die sich auf dem Dialysator abspielten und auf die Substanzen gerichtet, welche dort zurückblieben. Hierdurch erklärt es sich auch, warum wir in den physiologisch-chemischen Arbeiten unter Anwendung der Dialyse nur wenige Angaben über die Reihenfolge und Zeit des Austritts verschiedener Substanzen finden. Ferner, warum die Angaben über die Diffusibilität eiweissartiger Substanzen im Allgemeinen so überaus unzureichend und einander widersprechend sind, so dass man sogar noch die von Graham aufgestellten Unterschiede der krystalloiden und colloidalen Substanzen aufrecht halten will.

Zur Vermeidung dieser aufgeführten Unvollkommenheiten in der Ausführung der chemischen Dialyse eiweisshaltiger Lösungen oder Substanzen war es durchaus nothwendig, die Flüssigkeiten vor allen freiwilligen Zersetzungen zu schützen, um unabhängig von Temperatur und Zeit, die einzelnen Erscheinungen verfolgen, beobachten und qualitativ wie quantitativ untersuchen zu können. Ferner musste das Diaphragma derartig gewählt werden, dass man vor zufälligen Aufweichungen und Zerreibungen sicher sein konnte, selbst wenn der Versuch nicht in wenigen Tagen, sondern erst in Wochen zum Abschluss gebracht werden konnte.

Aus diesem Grunde verwarf ich jedes Pergamentpapier und wählte die thierische Blase oder den Darm. Diese wurden dazu erst in Wasser eingeweicht, dann so viel als möglich mechanisch von Fetttheilchen gereinigt und schliesslich noch zu verschiedenen Malen mit Aether behandelt. So bearbeitete thierische Blasen oder Darme wurden dann unter Aether aufgehoben, worin sie selbst während Jahre liegen können, ohne auch nur im mindesten von ihrer Brauchbarkeit zum Versuch einzubüssen. Hierdurch ist man in den Stand gesetzt, immer einen grösseren Vorrath gereinigter Blasen oder Darme zur Disposition zu haben, obgleich auch eine Blase zu mehreren Versuchen der Reihe nach verwendet werden kann.

Als Aussenflüssigkeit benutzte ich Chloroformwasser, erhalten durch Schütteln von Wasser mit Chloroform im Ueberschuss und späteres Abstehenlassen, oder reinen Aether.

Um die Bedeutung dieser Abänderungen in der Anordnung der chemischen Dialyse eiweisshaltiger Lösungen oder Substanzen in's richtige Licht zu stellen, ist es erforderlich, dass wir jetzt jede Art derselben eingehender kennen lernen.

Dialyse unter Anwendung von Chloroformwasser.

Die Anwendbarkeit und Bedeutung des Chloroformwassers als Aussenflüssigkeit bei der chemischen Dialyse beruht auf den ausgezeichneten antiseptischen Eigenschaften des Chloroforms, selbst in minimalen Mengen. Diese Eigenschaft des Chloroforms ist bekannt; dass aber dieselbe auch dem Chloroformwasser zuzuschreiben ist, scheint, trotz gelegentlicher Hinweisungen darauf von meiner Seite, wenig Eingang und Anklang gefunden zu haben. Aus diesem Grunde halte ich es für geboten und für gerechtfertigt, wenn ich mich hier über die Einführung und Benutzung eines solchen Wassers ausführlicher ausspreche.

Im Jahre 1849 richtete Dr. Augend im „Journal de Chimie médicale“ die Aufmerksamkeit auf die ausgezeichneten antiseptischen Eigenschaften des Chloroforms, zumal dem gewöhnlichen Aether gegenüber. Als Beleg führte er folgenden Parallel-Versuch aus. Drei Gläser mit breiten ein-

geschliffenen Stöpseln wurden genommen; in's erste Glas wurden einige Tropfen Aether, in's zweite ebensoviel Chloroform gegeben, während das dritte Glas leer blieb. Darauf legte man in jedes Glas ein Stück Fleisch und schloss dieselben. Nach einigen Augenblicken zeigten sich schon folgende Erscheinungen: im Glase mit Chloroform hatte das Fleisch eine gelbrothe Farbe angenommen, in dem mit Aether zeigten sich gar keine Veränderungen. Eine Woche später zeigte das Fleisch im Glase mit gewöhnlicher Luft keine Veränderungen; im Glase mit Aether war das Fleisch dunkel geworden, und im Glase mit Chloroform hatte das Fleisch das Aussehen angenommen, als ob es gekocht worden wäre. Beim Oeffnen ergab sich, dass das Fleisch im Glase mit Luft und in dem mit Aether faulte und unangenehm roch, während das Fleisch im Glase mit Chloroform unverändert geblieben war, nur hatte es einen widerlichen Geschmack und Geruch nach Chloroform.

Diese Versuche veranlassten im Jahre 1866 den damaligen Chemiker bei der Verwaltung der kaukasischen Mineralwässer in Piütiporsk, Th. Schmidt, zu ähnlichen Versuchen, nur mit dem Unterschiede, dass er an Stelle des Chloroforms Wasser mit Chloroform gesättigt anwendete. Die antiseptischen Eigenschaften des Chloroforms kamen auch hier vollständig zur Geltung, und während Monate war es ihm gelungen, verschiedene Präparate aus dem Pflanzen- und Thierreich ohne sichtbare Veränderungen der äusseren Formen aufzubewahren. Erst im Frühjahr 1867 berichtete Th. Schmidt über seine Beobachtungen in einem besonderen Vortrage in der Versammlung der russischen balneologischen Gesellschaft in Piütiporsk und schlug die Anwendung des Chloroformwassers als ausgezeichnetes Mittel zum Aufbewahren organischer Präparate zu histologischen Studien den Anatomen wie allen Naturforschern vor.

Im Sommer desselben Jahres war ich auf Veranlassung des Statthalters des Kaukasus-Gebietes nach Piütiporsk zur Entscheidung einiger wichtiger balneologischer Streitfragen geschickt und machte bei dieser Gelegenheit nicht allein die Bekanntschaft von Th. Schmidt, dem wir die

sorgfältigsten chemischen Analysen aller einzelnen Mineralquellen in und um Piütiporsk verdanken, sondern überzeugte mich auch durch eigene Anschauung von der Vortrefflichkeit des Chloroforms als antiseptischen Mittels. Ich benutzte dasselbe auch sofort zur Aufbewahrung verschiedener Quellenabsätze organischen Ursprungs aus den heissen Schwefelquellen von Piütiporsk, so dass ich später diese Präparate nicht allein in Tiflis eingehender mikroskopisch untersuchen, sondern dieselben auch noch bis heute in unverändertem Zustande aufbewahren konnte.

Seit jener Zeit benutze ich beständig das Chloroformwasser zur Aufbewahrung derartiger Präparate aus dem Pflanzen- und Thierreich, die zu histologischen Untersuchungen benutzt werden sollen, und das Verfahren, das ich dabei einhalte, stellt sich am deutlichsten heraus, wenn ich auf einige Beispiele ausführlicher hinweise.

Im Herbst 1871 wurden reife, ganz frische Weintrauben mit Stengeln und einigen Blättern in verschiedene Glasgefässe mit eingeschliffenem Glasstöpsel, die mit Chloroformwasser angefüllt waren, hineingehängt. Schon nach einigen Augenblicken machte sich die Einwirkung des Wassers bemerkbar. Von der Oberfläche der einzelnen Beeren aus bemerkte man Strömungen, die sich zum Boden des Glasgefässes hin verbreiteten und dabei das Wasser schwach gelblich färbten. Nach einigen Tagen wurde das Chloroformwasser in einigen der Gefässe erneuert, in anderen dagegen wurden zum Wasser nur einige Tropfen Chloroform wieder hinzugesetzt und umgerührt. Die Einwirkung des Chloroformwassers auf die Trauben und Blätter — ein einfacher Auslaugungsprocess — ging ohne Unterbrechung vor sich; die Farbe der hellen Weinbeeren und der grünen Blätter ging allmählich in eine bräunliche, später braune, über, während die Farbe der blauen Weinbeeren (Saperavi) sich ohne Veränderung erhielt. In einigen Glasbüretten wurde das Chloroformwasser regelmässig alle acht Tage gewechselt, erneuert und dabei immer 200 Ccm. des abgegrossenen Wassers nach gehörigem Eindampfen auf den Gehalt an Zucker geprüft, um hierdurch einen bestimmten Anhaltspunkt für

die Schnelligkeit des Auslaugens des Zuckers zu erhalten. Es ergab sich hierbei, dass ungefähr nach einem zwölfmaligen Wechsel des Wassers aller Zucker ausgezogen worden war. Von diesem Zeitpunkte an wurde das Chloroformwasser viel seltener gewechselt, ja bei einigen dieser Präparate ist es in den letzten vier Jahren gar nicht mehr verändert worden, und trotzdem haben sich keine Zersetzungen eingestellt.

Diese an den Weintrauben zuerst gemachten und verfolgten Erscheinungen des allmählichen Auslaugens führten mich auf den Gedanken der Benutzung des Chloroformwassers im Allgemeinen zu dialytischen Versuchen.

Das zweite Beispiel stammt aus dem Jahre 1874, wo ich auf Veranlassung der kaukasischen landwirthschaftlichen Gesellschaft einige Versuche über die Zucht der Seidenraupen ausführte. Im Verlauf derselben erschien es mir wünschenswerth, zur Veranschaulichung des Vorganges des Einspinnens, des Verpuppens der Seidenraupe und des späteren Austritts des Schmetterlings einige Präparate unter Anwendung des Chloroformwassers anzufertigen. In dieser Absicht wurden in sechs Probircylinder von 3 Cm. Oeffnung und 30 Cm. Höhe je eine Raupe aus dem letzten Stadium gegeben. Der erste Cylinder wurde darauf gleich mit Chloroformwasser angefüllt, mit einem Kork geschlossen und dieser mit Siegellack sorgfältig überzogen. In den anderen fünf Gläsern begannen die Raupen unverzüglich das Einspinnen, und je nachdem sie darin vorgeschritten waren, wurden sie durch Auffüllen von Chloroformwasser getödtet, mit Ausnahme des letzten Glases. Dieses blieb nach dem Abschlnss der Coconbildung bis zum Ausschlüpfen des Schmetterlings stehen, und erst als dieser sich oberhalb des Cocons vollständig entfaltet hatte, wurde auch dieses Glas mit Chloroformwasser angefüllt und, wie oben, geschlossen. Nach einigen Wochen wurde das Chloroformwasser in allen sechs Gläsern nicht allein erneuert, sondern ausserdem noch in jedes Glas einige Tropfen Chloroform hineingegeben. Seitdem stehen diese Präparate ohne Veränderung, nur haben die Raupen nach und nach eine dunkle Farbe angenommen.

Das letzte Beispiel entnehme ich meinen Studien über das Blut. Wenn man durch Wasser einen Strom gewaschener Kohlensäure streifen lässt und dabei frisches defibrinirtes Säugethier- oder Vogelblut in kleinen Portionen hineintröpfeln lässt, so nimmt das Wasser die Blutfarbe an und schäumt stark. Unterbricht man nach einiger Zeit den Kohlensäurestrom, so sondert sich in der Ruhe ein leichter Niederschlag aus der Flüssigkeit ab. Diesen kann man nach dem Abziehen der überstehenden klaren, blutfarbigen Flüssigkeit mit kohlensäurehaltigem Wasser zu wiederholten Malen auswaschen und erhält schliesslich einen farblosen oder schwach bräunlich gefärbten Rückstand, der unter dem Mikroskop betrachtet, in unveränderter Form die Hüllen der rothen Blutkörperchen und die weissen Blutkörperchen zeigt. Derartig dargestellte Blutkörperchenhüllen werden schon während acht Jahren in Chloroformwasser aufbewahrt und zeigen durchaus keine Veränderungen.

Diese Thatfachen, und zwar insonderheit die an den Weintrauben gemachten Beobachtungen, liessen mich in dem Chloroformwasser ein vorzügliches Mittel erkennen, um ganz im Allgemeinen organische Substanzen einem vollständigen Auslaugungsprocesse unterwerfen zu können, ohne dabei irgend welche Zersetzungsprocesse befürchten zu müssen. Es kam hierbei nur noch darauf an, dass man in jedem einzelnen Falle die erhaltenen Auszüge leicht von den ausgelaugten Körpern trennen kann, ohne dabei zu der zeitraubenden Operation der Filtration seine Zuflucht nehmen zu müssen. Wo der auszulaugende Körper gleichsam schon an und für sich ein geschlossenes Ganzes bildet, wie bei den Weintrauben, da waren alle Bedingungen zur unmittelbaren Bildung von klaren Flüssigkeiten gegeben. Anders ist es aber, wenn man Gemenge von löslichen und unlöslichen Substanzen mit Chloroformwasser behandeln will. In solchen Fällen muss man sich gleichsam eine künstliche, gemeinschaftliche Hülle verschaffen, und diese findet man in der thierischen Blase oder im Darm.

Den auszulaugenden Körper giebt man in die Blase hinein, bindet dieselbe mit einem Faden weisser Seide zu und

hängt sie darauf in ein Stöpselglas, das zum Theil mit Chloroformwasser angefüllt ist. Jetzt beginnt die Dialyse, die man mit aller Ruhe bis in die kleinsten Einzelheiten hinein verfolgen kann, ohne das Eintreten irgend welcher anderer Zersetzungen befürchten zu müssen, nur muss man sicher sein, dass der Glasstöpsel gut schliesst, und die Aussenflüssigkeit immer nach Chloroform riecht. Unter diesen Verhältnissen ist man vollkommen Herr des Versuches, kann das Chloroformwasser wann und so oft man will, erneuern, die einzelnen Diffusate untersuchen oder aufheben, — nur müssen solche Lösungen immer nach Chloroform riechen.

Wenn man grössere Quantitäten irgend einer Substanz in solcher Weise der Dialyse unterwerfen will, so ist zu befürchten, dass nicht schnell genug hinreichende Mengen von Chloroform aus der Aussenflüssigkeit in das Innere der Blase hinein diffundiren, um dadurch die Substanz vor Zersetzungen zu schützen. In einem solchen Falle ist es geboten, ein bestimmtes Volum Chloroformwasser gleich beim Beginn des Versuches unmittelbar mit der Substanz zusammen in die Blase hineinzugeben.

Unter Anwendung dieses Verfahrens der chemischen Dialyse stellt es sich dann heraus, dass alle in Wasser löslichen Substanzen in mehr oder weniger rascher Zeit diffundiren, während alle in Wasser unlöslichen Substanzen vollständig zurückbleiben, und zwar ohne Veränderung ihrer chemischen Natur und Form.

Schliesslich muss ich darauf hinweisen, dass in vielen, ja in den meisten Fällen die chemische Dialyse die Erscheinungen eines viel complicirteren Processes darbietet, nämlich die einer vielfältigen Dialyse. Die erste, und die wir allein beständig verfolgen können, spielt sich zwischen der Aussenflüssigkeit und dem Blaseninhalt im Ganzen ab. In dem Verhältniss aber, als diese fortschreitet und tiefer auf den Inhalt der Blase eingreift, stellen sich im Innern der Blase besondere dialytische Erscheinungen in all' den Fällen ein, wo die der Dialyse unterworfenen Substanz aus Zellen, oder auch aus Zellen in Zellen besteht. In solchen Fällen, und dieselben kommen fast immer vor, unterliegt der Inhalt dieser

Zellen, die Zellenflüssigkeit — die wir auch mit dem vielbedeutenden Namen „Protoplasma“ bezeichnen können — dem Einflusse der Dialyse, und als Folge davon verlieren die Zellen nicht allein ihren in Wasser löslichen Inhalt, sondern durch den gleichzeitigen Eintritt von Chloroformwasser in das Innere der Zellen finden dort Erschlaffungen und Zusammenziehungen verschiedener Hüllen oder anderer, in Wasser unlöslicher Substanzen statt, die sich im Verlaufe des ganzen dialytischen Processes mit Hülfe des Mikroskopes in ausgezeichneter Weise verfolgen und studiren lassen.

In wie weit die von mir hier in Vorschlag gebrachte Anordnung und Anwendung der chemischen Dialyse wirklich von Bedeutung für chemisch-physiologische Untersuchungen werden kann, wird sich am besten aus folgenden einzelnen Versuchen ergeben.

I. Hühnereiweiss.

Wie bekannt, besteht das Hühnereiweiss aus grossen, zarten, zellenartigen Hüllen, in welchen eine blass-gelbliche, alkalisch reagirende eiweisshaltige Flüssigkeit eingeschlossen ist. Um diese Flüssigkeit zu trennen, muss man die Hüllen mit einer Scheere zerschneiden, die ausgetretene Flüssigkeit nach hinlänglichem Verdünnen mit Wasser durch Leinwand coliren und abpressen, um sie später noch zu filtriren. Die Filtration einer solchen Flüssigkeit ist aber eine überaus missliche Sache, denn sie erfolgt überaus langsam und führt nie zu reinen Resultaten, was auch von Hoppe-Seyler¹⁾ angegeben wird, indem er aufführt, dass das Maschengewebe des Hühnereiweisses noch nicht genügend isolirt worden ist.

Unterwirft man ganz frisches Hühnereiweiss, wie man es unmittelbar nach dem Zerschlagen der Eischale und nach der Trennung vom Dotter erhält, nach dem von mir vorgeschlagenen Verfahren in einer thierischen Blase in Chloroformwasser, der Dialyse, so ergeben sich folgende Beobachtungen.

Ueberaus rasch beginnt die Diffusion des Eiweisses und

¹⁾ Hoppe-Seyler, physiolog. Chem. 1881, S. 777.

geht ohne Unterbrechung so lange von Statt, bis die letzten Spuren derselben ausgetreten sind. Es ist dazu nur erforderlich, die Aussenflüssigkeit von Zeit zu Zeit zu erneuern, und wenn man schliesslich ein bestimmtes Volum des Diffusates abdampft, so erhält man einen überaus minimalen Rückstand, in dem man, nach dem Auflösen in wenig Wasser durch eine Tanninlösung, nur Spuren von Eiweiss und durch Glühen im Platintiegel nur minimale Quantitäten eines feuerfesten Rückstandes nachweisen kann. Hat man dieses erreicht, so kann man den dialytischen Process als abgeschlossen ansehen.

Die verschiedenen Diffusate sind vollständig klar, reagiren schwach alkalisch. Beim Erwärmen und beim Kochen erfolgt durchaus keine Gerinnung, es entweichen dabei Spuren von Schwefelwasserstoffgas, die sich mit Leichtigkeit durch Bleipapier nachweisen lassen, und die auf Zusatz von Essigsäure noch viel stärker hervortreten. Setzt man aber zur klaren Lösung, vor dem Erwärmen, Essigsäure, so erfolgt eine Ausscheidung von Eiweiss, doch ohne Entwicklung von Schwefelwasserstoffgas, selbst nicht bei anhaltendem Kochen.

Alle diese Diffusate lassen sich im Wasserbade eindampfen ohne irgend welche Trübung, und wenn man schliesslich die concentrirte Lösung unter der Luftpumpe über Schwefelsäure und Chlorcalcium vollständig eintrocknet, so erhält man eine schwach-gelblich gefärbte, glasartige Eiweissmasse, die in Wasser vollständig auflöslich ist.

Der Rückstand in der Blase bildet eine weisse schleimige Masse, die in histologischer Hinsicht ein besonderes Interesse darbietet. Da mich augenblicklich ein tieferes Eingehen auf eine derartige mikroskopisch-histologische Untersuchung zu weit abführen würde, so stand ich von derselben vollständig ab, in der festen Ueberzeugung, dass sich bald jüngere Kräfte bereit finden werden, um diese angedeuteten Untersuchungen nicht allein aufzunehmen, sondern auch im Interesse der Embryologie durchzuführen. Nur soviel möchte ich mir erlauben noch hinzuzufügen, dass man unter dem Mikroskope in dieser Masse die feinsten Fibrillen, Nervenfasern und Ganglienzellen erkennen kann, zumal nach-

dem man die Präparate durch eine Eosinlösung gefärbt hat. Die Bilder derselben kann ich am besten dadurch veranschaulichen, wenn ich auf die Figuren 93, 94, 96 in Virchow's Cellularpathologie hinweise. Zwischen den genannten Formgebilden lassen sich noch einzelne Krystalle erkennen, über deren Natur ich mir kein Urtheil erlaube.

Mikroskopische Präparate aus diesem Rückstande lassen sich nach dem Färben mit Eosin in Glycerin ausgezeichnet aufbewahren.

Dieser Hüllenrückstand aus Hühnereiweiss ist in verdünnter Kalilösung leicht löslich, unter Entwicklung von Ammoniak. In einer solchen Lösung entsteht durch Zusatz von Essigsäure augenblicklich ein Niederschlag; kocht man aber erst die alkalische Lösung und setzt dann Essigsäure im Ueberschuss hinzu, so erfolgt nicht allein, wie früher, eine Fällung, sondern auch eine starke Entwicklung von Schwefelwasserstoffgas. In diesem Verhalten liegt der Beweis, dass diese unlöslichen Hüllen aus dem Hühnereiweiss nicht aus einer, dem unlöslichen Casein in der Milch, ähnlichen Substanz bestehen, sondern aus einem unlöslichen Albumin oder Nuclein.

II. Hühnereiweiss.

Frisches Hühnereiweiss wurde mit der Scheere zerschnitten, mit Wasser angerührt, colirt, und darauf die ziemlich klare, nur schwach opalisirende Flüssigkeit, von schwach alkalischer Reaction, nach einem Zusatz von Essigsäure im Wasser einige Zeit hindurch digerirt. Es erfolgte eine vollständige Ausscheidung des Eiweisses, so dass im Filtrat mit Salpetersäure keine Eiweissreaction mehr erhalten werden konnte. Das coagulirte Eiweiss wurde sorgfältig ausgewaschen, zwischen Fliesspapier leicht abgetrocknet, von demselben vorsichtig abgenommen und darauf in einem Stöpselglase mit Wasser durchgeschüttelt. Darauf wurden zur Masse einige Tropfen einer verdünnten Kalilösung gegeben und umgeschüttelt. Es erfolgte augenblicklich eine theilweise Lösung des Eiweisses, zugleich damit eine deutliche Entwicklung von Ammoniak, und die ganze Masse zeigte,

obgleich der grösste Theil des coagulirten Eiweisses noch ungelöst blieb, eine stark alkalische Reaction.

Um das so gebildete Kalialbuminat von dem noch unlöslichen Eiweiss zu trennen, wurde die ganze Masse in einer thierischen Blase der Dialyse in Chloroformwasser unterworfen. Das Diffusat bildete eine klare, alkalisch reagirende Lösung, während schliesslich in der Blase der Ueberschuss des coagulirten Eiweisses zurückblieb.

Weiter verfolge ich diese Thatsachen nicht, da es sich nur um einen Beleg für die Anwendung der chemischen Dialyse handelt.

III. Casein.

Vollständig entfettete Magermilch wurde nach hinreichendem Verdünnen mit Wasser durch Essigsäure gefällt. Das Casein schied sich rasch und vollständig ab, so dass es darauf mit Wasser leicht vollständig ausgewaschen werden konnte. Schliesslich wurde das Casein in einem Stöpselglase noch einmal mit Aether ausgeschüttelt, wodurch aber nur noch Spuren von Fett angezeigt werden konnten.

Das blendend weisse Casein wurde an der Luft getrocknet und darauf in einem Stöpselglase, in gleicher Weise wie im vorigen Versuche mit Eiweiss, mit Wasser und verdünnter Kalilösung behandelt, doch so, dass ein grosser Ueberschuss von Casein war. Der Inhalt des Glases bildete nach und nach einen Gallert mit eingelagerten weissen Flocken, zeigte eine überaus schwache alkalische Reaction, doch durchaus keine Entwicklung von Ammoniak, selbst nicht nach einem 48stündigen Stehen. Zu einer kleinen Lösung dieser Masse wurden noch einige Tropfen Kalilösung gegeben, wodurch rasch eine vollständige Auflösung erfolgte, doch zugleich machte sich auch eine deutliche Entwicklung von Ammoniak bemerkbar.

Um aus der gallertartigen Caseinmasse das gebildete Kalicaseinat auszuschcheiden, wurde die ganze Masse erst mit etwas Wasser angerührt und in einer Blase, in Chloroformwasser der Dialyse unterworfen. Der Zweck wurde vollständig erreicht. Es diffundirte rasch und vollständig eine

klare Lösung vom Kalicaseinat hindurch, während in der Blase der Ueberschuss an Casein zurückblieb, das sich durch eine deutlich saure Reaction auszeichnete.

Dialyse unter Anwendung von Aether.

Den Ausgangspunkt dieser Versuche bildeten meine osmotischen Versuche unter Anwendung von Aether, über die ich in zwei verschiedenen Artikeln¹⁾ schon berichtet habe. Dort beobachteten und verfolgten wir die unmittelbare Einwirkung auf einen, zu einem Ganzen geschlossenen Complex von Zellen; so auf Weintrauben, Kirschen, Pilze, oder auf kleine Thiere, wie Mäuse, Frösche, Eidechsen. Durch diese Versuche ergab sich, dass durch die unmittelbare Einwirkung des Aethers, gleichsam durch einen einfachen Verdrängungsprocess, aus dem Innern jener Objecte, alles Wasser mit den in demselben aufgelösten Substanzen und Salzen herausgedrängt wurde, wie sich andere Substanzen in Aether auflösten, und wie schliesslich alle einzelnen Zellen und Gewebe des Objectes von Aether vollständig durchdrungen und angefüllt wurden. Zugleich traten dabei noch secundäre Erscheinungen, in Folge des Zusammenwirkens von Flüssigkeiten verschiedener Zusammensetzung und Eigenschaften aus verschiedenen Zellen und Gefässen auf, die sich durch Ausscheidungen verschiedener amorpher, oder auch krystallinischer Verbindungen, im Innern des Objectes, oder auf der Oberfläche desselben, oder in den ausgetretenen Flüssigkeiten zeigten. Hierdurch wurden die Erscheinungen und das allgemeine Bild derartiger osmotischer Versuche überaus complicirt, verlieren aber dadurch durchaus nicht an Interesse und Bedeutung, nur muss man, um sie in's richtige Licht stellen zu können, erst mit einfachen Versuchen anfangen. In dieser Absicht wurden Substanzen thierischen oder pflanzlichen Ursprungs, deren Zusammensetzung schon bekannt ist, der chemischen Dialyse, unter Anwendung der thierischen Blase oder des Darmes, als Diaphragma, und von Aether als Aussenflüssigkeit, unterworfen.

¹⁾ Bull. Acad. St. Petersbourg **21**, 243—252; **22**, 533—550.

Die weitere Anordnung dieser Versuche ist durchaus dieselbe wie bei denjenigen mit Chloroformwasser.

Nach diesen einleitenden Worten können wir zu den einzelnen Versuchen übergehen.

Kuhmilch.

Sehr rasch nach dem Aufhängen der mit Milch gefüllten Blase in Aether beginnt die Dialyse. Auf der Oberfläche der Blase zeigen sich an verschiedenen Stellen einzelne farblose, wasserhelle Tropfen, die nach und nach an Volum zunehmen und schliesslich sich am Boden des Glases ansammeln. Zugleich damit findet ein Aufblähen der Blase statt, so dass sie sich erhebt, auf dem Aether schwimmt, um aber nach einiger Zeit zusammenzusinken und dann in den Aether hineinhängt. Die Dialyse schreitet ohne Unterbrechung fort; die ausgetretene Flüssigkeit nimmt zu, zeigt eine gelbliche Färbung, opalisirt und wird sogar trübe. Später werden die Erscheinungen schwächer und hören schliesslich ganz auf, so dass man die Dialyse als abgeschlossen betrachten kann. Um hierüber eine grössere Sicherheit zu erhalten, ist es am besten, die Blase in ein anderes Stöpselglas mit frischem Aether hineinzuhängen, und dort zu verfolgen, ob sich nach längerer Zeit noch einzelne Tropfen einer wässrigen Flüssigkeit zeigen oder nicht. Ist das Letztere der Fall, so unterwirft man den Aether einer Destillation und erhält dabei als Rückstand nur minimale Spuren eines fettartigen Rückstandes, so dass man daraus schliessen muss, dass Butter, selbst in einem Auflösungsmittel wie Aether, nicht die thierische Blase durchdringen kann.

Die mehr oder weniger trüben Diffusate werden darauf in einen graduirten Messcylinder zusammengegossen, die Gläser mit einem bestimmten Volum reinen Wassers nachgespült und schliesslich das ganze Volum der Diffusate bestimmt, um nun nach Wunsch die weitere Untersuchung derselben vornehmen zu können. In den meisten Fällen reagirt das Diffusat schwach sauer, daher die Trübung durch Ausscheidung von Casein, die aber nach Zusatz von verdünnter Essigsäure noch mehr zunimmt. Nachdem man das Casein

unter Anwendg. v. Chloroformwasser od. Aether etc. 245

durch Filtration getrennt hat, kann man im Filtrat in bekannter Weise das Albumin, Pepton, Zucker u. s. w. bestimmen.

Schliesslich schreitet man zur Untersuchung des Blaseninhalts.¹⁾ Beim Oeffnen der Blase zeigt sich zuerst eine Quantität Aether, die sich leicht abgiessen lässt. Darauf folgt eine weisse gallertartige Masse und unter dieser eine blendend weisse oder gelbliche Käsemasse, die die Form der Blasenspitze angenommen hat.

Frauenmilch.

In gleicher Weise kann man auch Frauenmilch der Aetherdialyse unterwerfen. Es sammelt sich alsdann am Boden des Glases eine farblose oder schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit an, und wenn man nach dem Schluss des Processes die Blase öffnet, so findet man in derselben Aether und einen unbedeutenden, gallertartigen Rückstand. Giebt man darauf zum Inhalt ein bestimmtes Volum Wasser, schüttelt um, schliesst wieder die Blase und giebt sie wieder in Aether, so erfolgt von Neuem die Dialyse. In dieser Weise kann man die Dialyse so lange wiederholen, bis sich im Diffusat die Gegenwart von Zucker nicht mehr nachweisen lässt. Untersucht man nun den Blaseninhalt, so findet man auf dem Boden der Blase eine Gallerte, aber durchaus keine Käsemasse, und ferner noch Aether, der in reichlicher Menge Fett aufgelöst hat. Untersucht man schliesslich die Gallerte unter dem Mikroskop, so besteht dieselbe theils aus unveränderten Milchkörperchen, theils aus deutlichen hyalinen Hüllen, theils aus einer granulirten Masse, die sich ebenso wie die Hüllen durch Eosin färben lassen und dadurch überaus deutlich hervortreten.

¹⁾ Dieser interessante Versuch, auf den ich in einer besonderen Arbeit: über die Zusammensetzung der Milch, in grösserer Ausführlichkeit zurückzukommen gedenke, wurde von mir in der Sitzung der kaiserlichen kaukasischen medicinischen Gesellschaft am 16./28. Decbr. 1878 demonstrirt.

Malz.

Frisch geschrotenes Malz (aus der Bierbrauerei von F. Wetzel in Tiflis) wurde in einer Reibschale zerrieben, abgesiebt und von dem so erhaltenen weissen, körnigen Mehl wurden 25,0 Grm. mit 50 Ccm. Wasser gemischt und, wie oben, in einer thierischen Blase der Dialyse unterworfen. In drei Tagen waren 30 Ccm. einer gelblich gefärbten, etwas trüben und sauer reagirenden Flüssigkeit ausgetreten, die sich sowohl durch einen starken Zuckergehalt, als auch durch kräftig wirkende Diastase auszeichnete.

Der Rückstand in der Blase wurde darauf wieder mit Wasser aufgerührt und wieder dialysirt, wobei in drei Tagen wieder 53 Ccm. einer klaren Flüssigkeit erhalten wurden, die reich an Zucker und Diastase waren.

Bierhefe.

Frische Bierhefe wurde durch ein feines Haarsieb geschlagen, darauf mit kaltem Wasser, durch Aufrühren und Absitzenlassen, zu wiederholten Malen ausgewaschen, bis das Wasser nicht mehr sauer reagirte, und darauf der Dialyse unterworfen.

Die thierische Blase blähte sich bald nach dem Hineinhängen in Aether auf, so dass sie schwamm, doch nach einiger Zeit fiel sie zusammen und sank in den Aether hinab. Zu gleicher Zeit zeigten sich einige, mehr oder weniger bräunlich gefärbte Tropfen, die sich nach und nach am Boden des Gefässes zu einer klaren Flüssigkeit ansammelten. Die Dialyse war in vollem Gange, nahm nach und nach wieder ab, um schliesslich ganz aufzuhören. Hiervon überzeugte man sich am besten, wenn man die Blase in ein Glas mit frischem Aether hineingab und sich nach 24 Stunden am Boden keine Wassertropfen zeigten. Ist dieses erreicht, so nimmt man die Blase heraus, öffnet sie, um mit einem Glasstabe eine kleine Probe der einmal dialysirten Hefe zur mikroskopischen Untersuchung herauszunehmen, und um darauf ein bestimmtes Volum Wasser in die Blase hineinzugeben. Hat man dieses gethan, so bindet man die Blase wieder zu, schüttelt den Inhalt derselben sorgfältig um und

giebt schliesslich die Blase wieder in frischen Aether hinein. Es erfolgt die zweite Dialyse, die Erscheinungen bleiben dieselben, und nach dem Schluss derselben leitet man eine dritte Dialyse u. s. w. ein, bis man sich durch die mikroskopische Untersuchung der rückständigen Hefe und durch die Prüfung des Diffusats überzeugt hat, dass der Process als abgeschlossen angesehen werden kann. Untersucht man darauf die einzelnen diffundirten Lösungen in Wasser der Reihe nach, so findet man, dass die ersten derselben ein überaus starkes Invertirungsvermögen von Rohrzucker besitzen; in den späteren nimmt dieses Vermögen mehr ab, und in den letzten lässt es sich gar nicht mehr constatiren, worin dann ein Anzeichen für den Schluss des ganzen dialytischen Processes zu sehen ist. Somit enthalten diese Lösungen nicht unbedeutende Quantitäten von Invertin. Ausserdem liessen sich in den Diffusaten noch Leucin, Tyrosin, Glycerinphosphorsäure, Albumin, Pepton nachweisen, und auch quantitativ bestimmen.

Die Aetherlösung giebt nach dem Abdampfen an der Luft einen unbedeutenden Rückstand, der zum grössten Theil aus feinen, krystallinischen Nadeln besteht, die in Alkohol leicht löslich sind. Die Natur dieser Nadeln ist noch nicht näher festgestellt worden, nur soviel ist gewiss, dass sie nicht aus Cholesterin bestehen. Ausser diesem Körper enthält der Rückstand noch Spuren von Buttersäure und Essigsäure, bei völliger Abwesenheit von Phosphorsäure, die auf ein Vorhandensein von Lecithin hinweisen würde.

Der Rückstand in der Blase besteht aus einer dickbreiigen Masse, in der man in den meisten Fällen einzelne weisse, runde Körner untermischt findet, und die man durch Aufschlämmen in Wasser und Absitzenlassen trennen kann, da sie sich schneller zu Boden setzen als die Hefezellen. Diese Körner bestehen aus reinem Tyrosin.

Die einzelnen Hefezellen unter dem Mikroskop betrachtet, stellen sich als farblose Hüllen dar, in deren Innern man ein oder zwei dunkle Kerne bemerken kann, die bald in der Mitte, bald, und dieses meistens, an einer Seite der Hülle anliegen. Durch eine Eosinlösung werden die Hüllen

roth, durch Jodtinctur braun gefärbt; nach langem Kochen der Hüllen in Wasser, mit oder ohne Schwefelsäure, nahmen dieselben auf Zusatz von Jodlösung durchaus keine blaue Färbung an. Behandelt man unter dem Mikroskope auf dem Objectglase eine Probe eines solchen Hefenrückstandes mit concentrirter Schwefelsäure oder Salzsäure, so werden ziemlich rasch die farblosen Hüllen aufgelöst, während die früher in die Zellen eingeschlossenen kleinen Kerne frei werden und als kleine Tropfen, Oeltropfen, herumswimmen. Wie unter dem Mikroskope, so lässt sich derselbe Versuch auch im Grossen ausführen. Hierbei färbt sich die concentrirte Schwefelsäure erst braun, dann schwarz. Nach einiger Zeit mischt man die ganze Masse in kleinen Portionen mit Wasser, um jede Erwärmung zu vermeiden, wobei sich die bräunlich gefärbten Massen in reichlichster Menge absondern. Schliesslich wird diese Flüssigkeit mit Aether ausgeschüttelt, aus dem man durch Abdampfen einen Rückstand erhält, der alle Eigenschaften eines Oeles oder Fettes besitzt.

In einem quantitativen Versuche erhielt ich aus dem bei 100° getrockneten Hefenrückstande nach dem Abschluss der Dialyse 13,52 % eines ölartigen Rückstandes von gelblicher Farbe, der bei höherer Temperatur, unter Verbreitung eines Geruchs nach Bernsteinsäure verbrannte. Dieses Oel liess sich durch Behandeln mit einer alkoholischen Kalilösung vollständig verseifen.

Wenn die mitgetheilten Thatsachen gewiss schon die Bedeutung der chemischen Dialyse, unter Anwendung von Aether, für eine specielle Untersuchung der Hefe in deutlichster Weise darlegen, so möchte ich doch noch zum Schluss die Resultate einer quantitativen Analyse einer Bierhefe hinzufügen.

In 100 Theilen der dickbreiigen Hefe wurden gefunden:

Wasser	87,66 %
Albumin	0,16 „
Invertin	0,52 „
Extractivstoffe	6,35 „
Hefenrückstand	5,22 „
Aetherrückstand	0,17 „
	<hr/> 100,08

Hieraus ergibt sich für die bei 100° getrocknete Hefe:

Albumin	1,29 %
Invertin	4,19 „
Extractivstoffe	51,12 „
Hefenrückstand	42,02 „
Aetherrückstand	1,38 „
	<hr/> 100,00

Diese Resultate bestätigen und erweitern in ausgezeichneter Weise die Beobachtungen von Prof. von Nägeli, die er in seiner bekannten Abhandlung: „Ueber die chemische Zusammensetzung der Hefe“ niedergelegt hat, auf die ich aber hier gegenwärtig nicht näher eingehen kann.

Das hier über Hefe Mitgetheilte entnehme ich einer grösseren Arbeit, die schon seit einigen Jahren als fast abgeschlossen im Manuscript vorliegt, aber der Oeffentlichkeit nicht übergeben wurde, da noch eine Reihe von Elementaranalysen durchaus wünschenswerth war, zu deren Ausführung ich aber, durch verschiedene Umstände und Verhältnisse verhindert, nicht kommen konnte. Hoffentlich gelingt es mir, in nächster Zeit das Versäumte nachzuholen.

Tiflis, 20. Januar 1883.

Studien über Milch;

von

Heinrich Struve.

Im December 1878 und im März 1879 machte ich der kaiserlichen kaukasischen medicinischen Gesellschaft in Tiflis Mittheilungen über die chemische Zusammensetzung der Milch, wobei ich mich auf osmotische Erscheinungen, hervorgerufen mit Hülfe von Kalbsblasen und von mit Chloroform gesättigtem Wasser oder von Aether als Aussenflüssigkeit stützte. Hierbei sprach ich mich in bestimmtester Weise für die Existenz von Hüllen der Milchkügelchen aus. Damals legte ich auch verschiedene analytische Resultate vor, fügte aber hinzu, dass es nothwendig und wünschenswerth wäre, das Ausgesprochene durch neue Beobachtungen, Versuche und chemische Analysen noch mehr zu bestätigen.

Seitdem sind drei Jahre vergangen, und wenn ich jetzt zu diesem Gegenstande wieder zurückkehre, so liegt die Veranlassung dazu in der Schrift von Dr. Th. Biedert¹⁾: „Die Kinderernährung im Säuglingsalter“, die ich erst im Sommer vorigen Jahres kennen lernte, und in den beiden Aufsätzen von Dr. Radenhausen²⁾ über Frauenmilch.

Mit den von Biedert und Radenhausen ausgesprochenen Ansichten über die Eigenschaften und Existenz des

¹⁾ Th. Biedert, die Kinderernährung im Säuglingsalter. Stuttgart 1880.

²⁾ Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. phys. Chem. 1881, 5, 13 u. 272.